

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA E INGENIERO AMBIENTALES**

**TEMA:
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MANGANESO
PEROXIDASA EN MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL SUELO DEL PÁRAMO
DEL VOLCÁN CHILES, PROVINCIA DEL CARCHI, PARA EVALUAR SU
POTENCIAL COMO BIODEGRADADORES DE PLÁSTICO POLIETILENO (PE)**

**AUTORES:
KAREN JESSENIA PAUCARIMA ALVAREZ
BRYAN SAÚL QUIROLA MORALES**

**TUTOR:
PATRICIA MARIBEL GUTIÉRREZ SALAZAR**

Quito, agosto del 2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotros, Karen Jessenia Paucarima Alvarez con documento de identificación N° 172362976-0 y Bryan Saúl Quirola Morales con documento de identificación N° 172398775-4, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MANGANESO PEROXIDASA EN MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL SUELO DEL PÁRAMO DEL VOLCÁN CHILES, PROVINCIA DEL CARCHI, PARA EVALUAR SU POTENCIAL COMO BIODEGRADADORES DE PLÁSTICO POLIETILENO (PE), mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIERA E INGENIERO AMBIENTALES, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Karen Jessenia Paucarima Alvarez

172362976-0



Bryan Saúl Quirola Morales

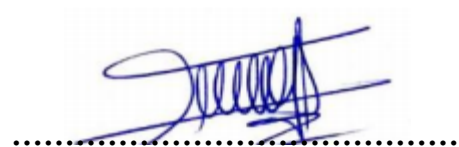
172398775-4

agosto, 2020

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el Trabajo Experimental, DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MANGANESO PEROXIDASA EN MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL SUELO DEL PÁRAMO DEL VOLCÁN CHILES, PROVINCIA DEL CARCHI, PARA EVALUAR SU POTENCIAL COMO BIODEGRADADORES DE PLÁSTICO POLIETILENO (PE), realizado por Karen Jessenia Paucarima Alvarez y Bryan Saúl Quirola Morales, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, agosto 2020



Patricia Maribel Gutiérrez Salazar

C.I. 171842722-0

DEDICATORIA

A mi padre gracias por la dedicación y el esfuerzo que ha realizado durante estos años para que nunca me falte nada a mí, a mis hermanos, a pesar de todo siempre has sabido darme buenos consejos, inculcarme desde niña a no rendirme y a luchar por lo que quiero.

A mi madre mi mejor amiga, confidente que siempre esta presta a escucharme, aconsejarme, con tu amor, comprensión siempre me has ayudado a no vencerme frente a cualquier obstáculo, mi mejor compañera de cocina y de largas conversaciones, sé que siempre podré contar contigo para lo que necesite. LOS AMO.

A mis hermanos, Paúl gracias por ser mi mejor amigo y acompañarme en mis largas noches de estudio, hacerme reír, hacerme comer a media noche, reírte cuando lloraba por tener tantos deberes, sin tu apoyo, tu alegría en momentos de estrés y tristeza no lo hubiera logrado. Melany por ser la alegría de la casa, mi motivo para seguir avanzando para darte un buen ejemplo y que seas mejor que yo, eres la más consentida de todos y sabes que siempre estaré para ti cuando me necesites.

A Cathy y Stevenks por compartir buenos y malos momentos durante todo este largo camino han hecho de esta experiencia la más bonita y llevadera, al fin lo logramos.

A Saúl mi amigo y compañero de tesis por la paciencia que me tuviste durante la realización de esta tesis no lo hubiera logrado sin tu ayuda y positivismo.

A Ismael por todo el apoyo, el amor que me brindaste durante todo este camino, alegrándome con tus ocurrencias, por buscar lo mejor para mí y alentarme a luchar por conseguir nuestros objetivos.

Karen

A ti mamá, el amor de mi vida, quien ha sido la persona que siempre creyó en mí, y quien jamás dudo ni un segundo en que lo lograría, a ti mamá por confiar en mí, por acompañarme sentada a lado mío todas esas largas noches de estudio, alentándome a seguir, a ti mamá por convertirme en una excelente persona, con amor y valores, a ti mamá por ser mi trébol de cuatro hojas, a ti mamá por un millón de razones más. ¡Te amo mi querida Taty!

A mi padre por despertarse cada madrugada para ir al trabajo con todo el amor del mundo y permitirme estudiar, gracias papito bello por el esfuerzo que haces para darme lo mejor, no sabes lo afortunado que soy de tenerte, eres un padre fantástico.

A mis hermanos Josué e Isaac, por ser mi inspiración, la razón que me impulsa cada mañana a ser mejor ser humano, son el motorcito de mi vida, gracias por la infinidad de buenos momentos que he pasado con ustedes, gracias por espuelear a mi lado, son maravillosos, los amo muchachos.

A mis abues, Margarita y Manuel por estar presentes en este largo camino y ayudarme en todo momento, por ser esa luz que me encanta mirar.

A mi tía Narcisa, por estar pendiente de mi familia y de mí toda la vida, gracias mi tía linda porque eres como mi angelito de la guarda.

A Karen que se convirtió en una persona valiosa en mi vida, por ser de esas personas que llegan a sumar y de las cuales aprendes tanto.

A Steven, Cathy y Wilson por el apoyo que me brindaron en todo este transcurso de mi carrera universitaria y por los tantos buenos momentos compartidos.

Saúl

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a Dios y a la vida por darnos la oportunidad de culminar este trabajo, y por todo lo bueno que nos ha brindado durante esta experiencia.

A nuestras familias por ser el motivo de superación y de fuerza para lograr nuestros objetivos.

A la Universidad Politécnica Salesiana por permitirnos alcanzar esta meta, y en especial por ser el lugar donde vivimos grandes experiencias y conocimos grandes amigos.

A nuestra tutora Ing. Patricia Gutiérrez por compartir sus conocimientos, brindarnos su tiempo para poder culminar esta investigación de la mejor manera.

A Carlitos Vélez por la gran ayuda que nos brindó en el laboratorio a través de su conocimiento y experiencia.

Karen y Saúl

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1. Plástico.....	5
3.2. Polietileno	6
3.3. Contaminación por plástico	7
3.4. Biorremediación	7
3.5. Tipos de Biorremediación	8
3.5.1. <i>Degradación enzimática</i>	8
3.5.2. <i>Remediación microbiana</i>	8
3.5.3. <i>Fitorremediación</i>	8
3.6. Suelo	9
3.7. Suelo de páramo	9
3.8. Muestreo de suelo	10
3.8.1. <i>Muestra Simple:</i>	10
3.8.2. <i>Muestra compuesta</i>	10
3.9. Microorganismos	11
3.9.1. <i>Bacterias</i>	11

3.9.2.	<i>Hongos</i>	11
3.10.	Siembra de microorganismos	12
3.10.1.	<i>Siembra en superficie</i>	12
3.10.2.	<i>Siembra en doble capa</i>	12
3.11.	Aislamiento de microorganismos	13
3.11.1.	<i>Aislamiento por estriado o agotamiento</i>	13
3.12.	Medios de Cultivo	13
3.13.	Agar Papa Dextrosa	14
3.14.	Agar de soja tríptico	14
3.15.	Agar Sabouraud-Dextrosa	15
3.16.	Enzimas	15
3.17.	Actividad enzimática de Manganese peroxidasa.....	16
3.18.	Determinación de Manganese Peroxidasa.....	16
3.18.1.	<i>Método de oxidación del rojo fenol</i>	17
3.19.	Actividad Específica.....	17
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1.	Fase de campo	18
4.1.1.	<i>Descripción del área de estudio</i>	18
4.2.	Ubicación geográfica.....	21
4.3.	Muestreo	22

4.4.	Fase de laboratorio.....	24
4.5.	Preparación de medios de cultivo	26
4.5.1.	<i>Agar Papa Dextrosa</i>	26
4.5.2.	<i>Agar Sabouraud-Dextrosa</i>	26
4.5.3.	<i>Agar Soja Trypticase</i>	27
4.6.	Cultivo de microorganismos del suelo de páramo.....	28
4.7	Aislamiento de microorganismos	29
4.8	Obtención de extracto enzimático	30
4.9.	Pruebas de actividad enzimática de manganeso peroxidasa	32
4.10.	Medición de la actividad específica.....	33
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1.	Cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm	35
5.2.	Cepas aisladas en la altitud 3 800 msnm	41
5.3.	Cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm	46
5.4.	Actividad enzimática de Manganeso Peroxidasa.	51
5.4.1.	<i>Actividad enzimática en la altitud 3 600 msnm</i>	51
5.4.2.	<i>Actividad enzimática en la altitud 3 800 msnm</i>	52
5.4.3.	<i>Actividad enzimática en la altitud 4 000 msnm</i>	52
5.5.	Análisis Estadístico de actividad enzimática manganeso peroxidasa con respecto a la altitud.	53

5.6.	Actividad específica	57
5.6.1.	<i>Actividad específica en la altitud 3 600 msnm</i>	57
5.6.2.	<i>Actividad específica en la altitud 3 800 msnm</i>	59
5.6.3.	<i>Actividad específica en la altitud 4 000 msnm</i>	60
5.7.	Microorganismos con mayor actividad de manganeso peroxidasa como indicadores del potencial de biodegradación de plástico polietileno (PE)	62
5.7.1.	<i>Análisis estadístico para seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática en la altitud 3 600 msnm</i>	62
5.7.2.	<i>Análisis estadístico para seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática en la altitud 3 800 msnm</i>	64
5.7.3.	<i>Análisis estadístico para seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática en la altitud 4 000.</i>	66
5.7.4.	<i>Análisis estadístico general para seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática.</i>	69
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
6.1.	Conclusiones.....	73
6.2.	Recomendaciones	74
7.	BIBLIOGRAFÍA	75
8.	ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Puntos de muestreo altitud 4 000 msnm	19
Tabla 2 Puntos de muestreo altitud 3 800 msnm	20
Tabla 3 Puntos de muestreo altitud 3 600 msnm	21
Tabla 4 Materiales usados en la fase de campo	22
Tabla 5 Materiales usados en la fase de laboratorio.....	25
Tabla 6 Número de cepas aisladas por cada altitud	35
Tabla 7 Cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm.....	36
Tabla 8 Cepas aisladas en la altitud 3 800 msnm.....	41
Tabla 9 Cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm.....	46
Tabla 10 Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov	54
Tabla 11 Análisis de varianza para la presencia de actividad enzimática manganeso peroxidasa por altitud.....	54
Tabla 12 Método de agrupación de Tukey.....	55
Tabla 13 Análisis estadístico descriptivo de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por altitud.....	55
Tabla 14 Actividad específica en la altitud 3 600 msnm	57
Tabla 15 Actividad específica en la altitud 3 800 msnm	59
Tabla 16 Actividad específica en la altitud 4 000 msnm	60
Tabla 17 Análisis de varianza de actividad enzimática por cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm.	62
Tabla 18 Método de agrupación de Tukey de actividad enzimática por cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm	62

Tabla 19 Análisis estadístico descriptivo de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm.....	63
Tabla 20 Análisis de varianza de actividad enzimática por cepas aisladas en la altitud 3 800 msnm.	64
Tabla 21 Método de agrupación de Tukey de actividad enzimática por cepas aisladas en la altitud 3 800 msnm	65
Tabla 22 Análisis estadístico descriptivo de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por cepas aisladas en la altitud 3 800 msnm.....	65
Tabla 23 Análisis de varianza de actividad enzimática por cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm	66
Tabla 24 Método de agrupación de Tukey de actividad enzimática por cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm	67
Tabla 25 Análisis estadístico descriptivo de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm.....	67
Tabla 26 Análisis estadístico descriptivo de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por cepas aisladas en todas las altitudes	69
Tabla 27 Método de agrupación de Tukey de actividad enzimática por cepas aisladas en todas las altitudes	69
Tabla 28 Cepas que presentaron mayor actividad enzimática en todas las altitudes	70

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1 Toma de coordenadas de puntos de muestreo	18
Fotografía 2 Muestreo al azar.....	23
Fotografía 3 Delimitación de subparcelas	23
Fotografía 4 Toma de muestra de suelo, (B) Mezcla de submuestras en funda de basura, (C) Cuarteo, (D) Cooler para muestras representativas.....	24
Fotografía 5 (A) Medios de cultivo en placas de calentamiento, (B) Esterilización de los medios en el autoclave	27
Fotografía 6 (A) Dispensación del medio de cultivo, (B) Pesaje de suelo. (C) Muestra diluida, (D) Solidificación del medio, (E) Incubación.....	28
Fotografía 7 (A) Cepas sembradas después de 5 días, (B) Aislamiento por punción, (C) Incubación	29
Fotografía 8 (A) Incubación, (B) Agitación de muestras con acetato de sodio, (C) Centrifugación, (D) Producto de la centrifugación, (E) Extracto enzimático	31
Fotografía 9 (A) Reactivos, (B) Preparación de la muestra, (C) Colocación en baño maría, (D) Adición de H ₂ O ₂ , (E) Medición en el espectrofotómetro	33

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Actividad Enzimática (MnP) Altitud 3 600 msnm	51
Gráfico 2 Actividad Enzimática (MnP) Altitud 3 800 msnm	52
Gráfico 3 Actividad Enzimática (MnP) Altitud 4 000 msnm	53
Gráfico 4 Gráfica de las medias de actividad enzimática manganeso peroxidasa por altitud	56
Gráfico 5 Actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en la altitud 3 600 msnm	58
Gráfico 6 Actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en la altitud 3 800 msnm	60
Gráfico 7 Actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en la altitud 4 000 msnm	61

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Actividad enzimática	32
Ecuación 2 Actividad específica	33
Ecuación 3 Cálculo de proteína.....	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 3 600 msnm.	81
Anexo 2 Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 3 800 msnm	81
Anexo 3 Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 4 000 msnm	82
Anexo 4 Área de estudio en el páramo del volcán Chiles msnm.....	82
Anexo 5 Dispensación de medios de cultivos en las cajas Petri	83
Anexo 6 Crecimiento de microorganismos de la siembra en superficie	83
Anexo 7 Cepas aisladas del suelo del páramo.....	84
Anexo 8 Solidificación del agar en matraces Erlenmeyer para la obtención del extracto enzimático	84
Anexo 9 Incubación de los matraces Erlenmeyer para el crecimiento de microorganismos aislados	85
Anexo 10 Muestras en el agitador orbital	85
Anexo 11 Curvas de absorbancia	86
Anexo 12 Cálculos para preparación de solución madre de HCl.....	86
Anexo 13 Cálculos para la preparación del buffer succinato de sodio pH de 4,5.....	87
Anexo 14 Cálculos para la preparación del lactato de sodio.....	88
Anexo 15 Preparación de reactivos que se usaron en el método de oxidación del rojo fenol.	88

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el fin de buscar una alternativa que contribuya a la reducción de desechos plásticos de polietileno, para lo cual se plantea usar microorganismos que presenten actividad enzimática de manganeso peroxidasa para su biodegradación.

En este estudio se aislaron 56 cepas de microorganismos con características macroscópicas diferentes de un total de 9 submuestras de suelo, las cuales fueron tomadas en altitudes 3 600, 3 800 y 4 000 msnm en el páramo del volcán Chiles. Las muestras de suelo fueron llevadas al laboratorio para el aislamiento de microorganismos en agar Sabouraud, agar Patata Dextrosa y agar Soja Trypticase a una temperatura de incubación de 25°C por 5 días.

Se determinó la presencia de actividad enzimática de manganeso peroxidasa mediante el método de oxidación del rojo fenol, y se obtuvieron valores de actividad enzimática entre 0,54 U/L a 7,84 U/L. Además, se determinó la actividad específica que permite conocer la cantidad específica de enzima manganeso peroxidasa que hay por mg de proteína teniendo valores que van desde 0,32 hasta 10,11 U/mg de proteína.

Los microorganismos que presentaron la mayor actividad enzimática fueron 5 cepas colectadas a 3800 msnm. La cepa codificada como SB-3800-S1-C22 presentó un valor de 3,05 U/L, la cepa codificada como PDA-3800-S3-C35 un valor de actividad enzimática de 3,14 U/L, la cepa codificada como SB-3800-S3-C29 un valor de 4,20 U/L, la cepa codificada como SB-3800-S1-C53 un valor de 5,09 U/L y finalmente la cepa codificada como SB-3800-S2-C27 con un valor de 7,84 U/L. Las cepas que presentaron la mayor actividad enzimática son potenciales biodegradadores de plástico.

Palabras clave: Biodegradación, manganeso peroxidasa, hongos, páramo, polietileno.

ABSTRACT

This research aims to find an alternative to reduce waste plastic polyethylene using microorganism's manganese peroxidase enzymatic activity to polyethylene biodegradation.

56 strains of microorganisms were isolated divided by different macroscopic characteristics from a total of 9 subsamples. These subsamples were taken at an altitude of 3 600, 3 800 and 4 000 meters above sea level (masl) of the Chiles volcano located in Tufiño parish, Carchi province. The planting of soil samples was done by sowing on the surface technique using Sabouraud Agar, Dextrose Potato Agar, and Trypticase Soy Agar, the isolated strains were developed at 25 °C for an incubation time of 5 days.

The presence of manganese peroxidase enzymatic activity was determined by phenol red oxidation method, obtaining activity values ranging from 0.54 U/L to 7.84 U/L. Besides, the specific activity was determined. It allows knowing the specific amount of manganese peroxidase enzyme per milligram of protein establishing values ranging from 0.32 to 10.11 U/mg of protein.

The highest manganese enzymatic activity peroxidase by microorganisms was five: SB-3800-S1-C22 with value of 3,05 U/L, PDA-3800-S3-C35 with value of 3,14 U/L, SB-3800-S3-C29 with 4,20 U/L, SB-3800-S1-C53 with 5,09 U/L and finally SB-3800-S2-C27 with activity value of 7,84 U/L. The strains that exhibited the highest enzymatic activity are potential plastic biodegrades.

Keywords: Biodegradation, manganese peroxidase, fungi, wasteland, polyethylene.

ABREVIATURAS

°C:	grado centígrado
μl:	micro litro
U/L:	concentración de actividad enzimática
g:	gramo
ha:	hectárea
l:	litro
m:	metro
MnP:	Manganeso peroxidasa
MnSO₄:	Sulfato de Manganeso
msnm:	metros sobre el nivel del mar
nm:	nanómetro
PDA:	Agar Patata Dextrosa
PE:	polietileno
rpm:	revoluciones por minuto
SBD:	Agar Sabouraud-Dextrosa
TSA:	Agar Soja Trypticase

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la elevada producción, uso y desecho de plásticos hace que la situación mundial sea trágica. Según datos presentados por Estévez (2019) se estima que en el año 2020 la producción de plásticos se acercará a los 500 millones de toneladas. Los plásticos se han tomado el planeta Tierra y su principal problema está dado por la fácil dispersión y el lento proceso de degradación haciendo que este material se acumule especialmente en mares y océanos. Aproximadamente 8 millones de toneladas de plástico se depositan al año en ecosistemas marinos en donde se fragmentan formando fragmentos inferiores a 5 mm conocidos como microplásticos, los cuales por su reducido tamaño llegan a ser ingeridos por los animales marinos provocando alteraciones en la cadena trófica, afectando directamente al ser humano y la vida marina (Castellón et al., 2016).

Una alternativa para disminuir los problemas ocasionados por la contaminación que producen los plásticos es utilizar procesos biotecnológicos como la biorremediación que es una tecnología que usa el potencial metabólico de microorganismos para la destruir o transformar compuestos químicos en otros menos tóxicos. Además, en comparación con otras tecnologías, usar procesos de biorremediación suele tener bajos costos porque los microorganismos pueden ser usados *in situ*, eliminando de esta manera los costos de transporte y pasivos (Garzón et al., 2017).

En el caso de procesos de biorremediación de contaminación de plásticos se han realizado algunos estudios como el de un equipo de microbiólogos del Instituto de Tecnologías de Kioto en Japón donde han encontrado una bacteria que es capaz de digerir y asimilar el plástico polietileno (PE); otro estudio realizado por Shahid et al. (2018), muestra que hallaron la presencia de una enzima identificada como manganeso peroxidasa en el microorganismo *Amycolaptosis sp.* que fue

la que permitió la degradación del polietileno. Además, se indica que los hongos y bacterias que poseen esta enzima tienen la capacidad de degradar los polímeros de polietileno en dióxido de carbono y agua. En el análisis de degradación de polietileno presentados por Iiyoshi et al. (1997) se muestra que los microorganismos *T. versicolor* y *P. chrysosporium* por poseer actividad enzimática de manganeso peroxidasa aceleraron el proceso de biodegradación de polietileno en el lapso de 12 días, estos microorganismos fueron aislados de árboles de madera y también del suelo de bosques subtropicales.

Hasta la fecha no se reporta el uso de microorganismos presentes en suelo de páramo para degradar plástico, a pesar de que el suelo de páramo contiene el más alto número de grupos filogenéticos existentes, en un aproximado de 10^9 células bacterianas por cada gramo de suelo (Llambí, 2012). La abundante presencia de microorganismos es gracias a los distintos nutrientes que existen en el suelo de páramo y por la gran cantidad de humedad que posee (Benavides & Hermida, 2008).

Por lo mencionado anteriormente se consideró como sitio de estudio el páramo del volcán Chiles el cual está ubicado en la parroquia Tufiño, cantón Tulcán, provincia del Carchi. Se encuentra a una altitud de 3 200 msnm, está rodeado de ecosistemas de bosque de niebla, además de biodiversidad como frailejones, pajonales y flores. Cuenta con formaciones rocosas altas por las erupciones volcánicas, es de clima frío; por lo tanto, es un lugar que permite la exploración e investigación de los microorganismos que posee el suelo del lugar (Plan de Ordenamiento Territorial de la Provincia del Carchi, 2015).

La presente investigación se enfocó en la determinación de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa en microorganismos presentes en el suelo del páramo del volcán Chiles, provincia del Carchi, para evaluar su potencial como biodegradadores de plástico polietileno. Se

realizó aislamiento de microorganismos del suelo con el fin de identificar si existe actividad enzimática de manganeso peroxidasa y de esta manera seleccionar los que posean mayor actividad para que sean utilizados en estudios posteriores de biodegradación de plástico polietileno.

Para el estudio se planteó la siguiente hipótesis: los microorganismos presentes en el suelo del páramo del volcán Chiles poseen actividad enzimática de manganeso peroxidasa y tienen potencial de biodegradación del plástico polietileno.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo general:

Determinar la actividad enzimática de manganeso peroxidasa en microorganismos presentes en el suelo del páramo del volcán Chiles, provincia del Carchi, para evaluar su potencial como biodegradadores de plástico polietileno (PE).

2.2.Objetivo específico:

- Aislar microorganismos presentes en el suelo del páramo del volcán Chiles, provincia del Carchi.
- Identificar si existe actividad enzimática de manganeso peroxidasa en microorganismos aislados del suelo del páramo del volcán Chiles, provincia del Carchi.
- Seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática de manganeso peroxidasa como indicadores del potencial de biodegradación de plástico polietileno (PE).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Plástico

Los plásticos son materiales formados por cierto tipo de polímeros ya sean naturales o sintéticos con aditivos correspondientes para alcanzar las características deseadas para su uso. Los aditivos hacen que el plástico posea excelentes propiedades térmicas, aislantes, resistencia a bases, ácidos y disolventes (Castells, 2012).

Se denomina plásticos a un conjunto de materiales que presentan como característica principal moléculas muy grandes unidas de forma artificial. Son un grupo de materiales orgánicos en donde el carbono es el elemento principal, se encuentra combinado con otros elementos como el oxígeno, hidrógeno y nitrógeno. Es un material sólido cuando se encuentra en su estado final es decir cuando está listo para ser utilizado en la industria, pero puede llegar a ser lo suficientemente suave para ser moldeado en condiciones de calor y/o presión (Cornish, 1997).

El componente principal del plástico son polímeros, resinas artificiales que son derivados de la celulosa e hidrocarburos; en el caso del petróleo para producción de plástico se lo refina para poder formar monómeros, es decir, moléculas orgánicas pequeñas que al unirse forman polímeros que pueden ser moldeados o extruidos para fabricar productos de plástico (Cornish, 1997).

Existen varios tipos de plásticos: termoplásticos que son aquellos que al aplicarles calor se ponen blandos, se funden y pueden volverse a moldear para obtener otro producto; termofijos son aquellos que al aplicarles calor se degradan y carbonizan; y elastómeros que poseen alta elasticidad, se deforman cuando se someten a un esfuerzo pero vuelven a su forma original cuando se deja de ejercer fuerza sobre ellos (Madrigal, 2011).

3.2.Polietileno

Es un tipo de plástico que está formado por un derivado hidrocarburífero conocido como etileno, este monómero es el alqueno más pequeño, es un gas incoloro que posee un olor levemente dulce, es muy inflamable, reactivo y tiene la capacidad de formar con facilidad numerosos productos, dentro de estos el polietileno (Perdomo, 2002).

Es considerado un termoplástico, sus propiedades dependen de la masa molecular, ramificación de la cadena y el grado de cristalinidad. Todos los polímeros que son derivados del etileno poseen alta resistencia a los productos químicos, ácidos, bases, grasas, aceites, disolventes, no obstante, posee una resistencia moderada para los hidrocarburos normales y clorados (Perdomo, 2002).

El etileno al someterse a distintas temperaturas puede transformarse en dos polímeros de polietileno que puede ser de baja densidad ($0,92-0,93 \text{ g/cm}^3$) y de alta densidad ($0,94-0,97 \text{ g/cm}^3$). Está formado a temperaturas aproximadamente de 170°C y 1 400 atm de presión, posee una estructura muy ramificada y tiene como material resultante un sólido que es ligeramente flexible, además, posee una resistencia mecánica y química, es de bajo costo por lo cual es muy utilizado como papel de envolver, envasado, bolsas plásticas, fabricación de tuberías, entre otras. El polietileno de alta densidad es un termoplástico que se forma a partir del etileno a temperaturas inferiores a 70°C , es un polímero que es cristalino, tiene una cadena lineal y poco ramificada por lo que su resistencia térmica y química, dureza, impermeabilidad, opacidad es mayor que la del polietileno de baja densidad, pero con respecto a la resistencia al impacto y agrietamiento es menor; se usa en envases para contenedores de gases, líquidos, combustibles y en la industria de la construcción (Perdomo, 2002).

3.3.Contaminación por plástico

Los plásticos a pesar de tener varias aplicaciones en la vida cotidiana y representar un material completamente útil, por el incremento en su uso ha resultado insostenible el manejo que se debe dar a los desechos que generan. Segura et al. (2007) mencionan que la basura que generaban las actividades humanas hasta mediados del siglo XX era especialmente desechos biodegradables o reciclables, pero cuando se empezó a usar el plástico una gran parte de los desechos producidos por este material empezó a aglomerarse en el ambiente.

La fragmentación de los plásticos sintéticos es demasiado lenta a comparación de la fragmentación de los productos orgánicos que tardan de 3 a 4 semanas, las telas de algodón tardan en descomponerse alrededor de 5 meses, mientras que del plástico aproximadamente 500 años, generando partículas más pequeñas que no pueden verse, pero se acumulan en los ecosistemas. Los microplásticos son fragmentos de tamaños inferiores a los 5 mm, estos pequeños materiales se están acumulando de manera considerable en los mares, en arena de playas y estuarios. Hay reportes de presencia de 3 a 5 kg/km² de microplásticos en el mar con registros de hasta 30 kg/km². Se ha demostrado que los plásticos funcionan como transporte de contaminantes a los mares ya que se acumulan compuestos químicos tóxicos tales como los bifenilos policlorados, diclorofenil, dicloroetano y los nonifenoles que no son solubles en agua (Segura et al., 2007).

3.4.Biorremediación

Garbisu et al. (2002) dice que la biorremediación es un “proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes en ecosistemas marinos o terrestres” (p. 1). La biorremediación tiene potencial en la mitigación de la contaminación ambiental, esta técnica se ha enfocado en explotar la diversidad genética y la versatilidad metabólica que poseen las bacterias u otros microorganismos para transformar

compuestos contaminantes en productos menos tóxicos o productos inofensivos que puedan integrarse de forma sencilla en los ciclos biogeoquímicos naturales. Los procesos de biorremediación son los responsables de que una bacteria pueda degradar un contaminante, y lo pueda utilizar ya sea como sustrato de crecimiento o transformándolo en una sustancia con menor toxicidad mediante mecanismos de detoxificación (Delgadillo et al ., 2011).

3.5. Tipos de Biorremediación

3.5.1. *Degradación enzimática*

Es aquella que se basa en el uso de enzimas con la finalidad de degradar sustancias nocivas. Estas enzimas se suelen obtener en cantidades industriales por bacterias que tienen la capacidad de producirlas naturalmente, o también por bacterias que son modificadas genéticamente para producir ciertas enzimas y que son generalmente comercializadas por las empresas dedicadas a procesos biotecnológicos. Un ejemplo claro es el uso de las enzimas peroxidasas para empezar con la degradación de fenoles y aminas aromáticas que se encuentran en aguas residuales de muchas industrias (Garbisu et al., 2002).

3.5.2. *Remediación microbiana*

Está basada en el uso de microorganismos que pueden ser directamente del lugar en donde existe algún tipo de contaminación o pueden provenir de otros ecosistemas siendo incorporados o inoculados. La descontaminación se produce por la capacidad natural que tienen para convertir las moléculas tóxicas en sustancias más pequeñas que resultan menos nocivas (Garbisu et al., 2002).

3.5.3. *Fitorremediación*

“Es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, adsorber, acumular o tolerar altas concentraciones de

contaminantes como metales pesados” (Delgadillo et al., 2011.p. 597), una de las principales ventajas de este tipo de biorremediación es que las plantas son ideales para descontaminar superficies grandes.

3.6.Suelo

Es un cuerpo natural que está conformado por una parte sólida como minerales y materia orgánica, una parte líquida y una parte gaseosa que ocupa la superficie de la tierra, se encuentra constituida por horizontes o capas de materiales distintos a la roca madre. El suelo es el resultado de aditamentos, desgastes, transmisiones y transformaciones de materia y energía, que posee la capacidad de servir de soporte a las plantas con raíces en un medio natural (López, 2006).

3.7.Suelo de páramo

El suelo presente en el páramo, por lo general es de origen volcánico y técnicamente se lo conoce como andosol, término que proviene del japonés que significa “tierra negra”. Sus propiedades y morfología suelen variar de forma considerable dependiendo de los principales factores que involucra la edafogénesis; como la naturaleza, la composición química de los materiales, la edad y las condiciones climáticas (Cárdenas, 2015).

En nuestro planeta existe una gran variedad de tipos de páramos, por esta razón hay una gran diversidad de suelos de páramo. No obstante, esta diversidad de suelos no es mucha como la que se llega a tener en altitudes bajas con climas más abrigadores, esto se debe a que a mayor altitud el clima se vuelve más frío, lo que genera que sean más lentos los procesos de descomposición química de las rocas y formación de nuevos minerales (Llambí et al., 2012).

3.8.Muestreo de suelo

Se comprende como muestreo de suelo a la actividad de recolección de una cantidad de muestra representativa de suelo en un lugar y tiempo determinado, generalmente con la finalidad de realizar análisis en el laboratorio según sea el interés. De manera general, la muestra constituye las condiciones puntuales que presenta el suelo en el momento que fue colectada (Espinoza & Mendoza, 2017)

El muestreo de suelo, posiblemente sea la etapa más importante, ya que de esta se desprende cada una de las siguientes fases a la hora de desarrollar un proyecto de investigación, si se lleva a cabo de forma incorrecta el muestreo de suelo, los datos a obtener, resultado de los análisis realizados en el laboratorio, muy seguramente serán erróneos y de poca calidad, por ello el muestreo no es solo un hecho aislado que consiste en la toma de muestras de un determinado suelo, sino que va más allá, siendo completamente una estrategia metodológica que involucra el manejo, transporte y tratamiento de la muestra (Espinoza & Mendoza, 2017).

3.8.1. *Muestra Simple:*

Es aquella que ha sido tomada de una sola extracción de suelo, en un lugar y tiempo determinado. Son usadas en trabajos de investigación, suelos bastante homogéneos y extensión. Es recomendable que por cada hectárea de terreno se tome una muestra de 1 kilogramo de suelo (Villarroel, 2016).

3.8.2. *Muestra compuesta*

Es aquella constituida por un conjunto de muestras simples o también llamadas submuestras, las cuales son mezcladas en un mismo recipiente, de tal forma que se llega a obtener una muestra homogénea representativa, para posteriormente ser llevada al laboratorio para su

respectivo análisis, según sea el caso. Generalmente el número de submuestras necesarias para formar una muestra compuesta va a depender de la variabilidad de la propiedad a estudiar (Villarroel, 2016).

3.9. Microorganismos

Los microorganismos son seres numerosos y son considerados los más primitivos que existen en la Tierra, habitan todo ambiente del planeta ya sea agua, suelo y aire, se encuentran en interacción con animales, plantas y el hombre, además son parte de los procesos metabólicos, biotecnológicos y ecológicos que son fundamentales para sobrevivir. Se agrupan en dos categorías: procariotas y eucariotas, las archaeas y las bacterias están en el primer grupo, mientras que los hongos, algas y protozoarios en el segundo; los microorganismos son más diversos y versátiles que cualquier tipo de macroorganismo esto debido a la evolución que han tenido y por su forma rápida de adaptarse a distintos cambios ambientales (Montaño et al ., 2010).

3.9.1. Bacterias

Según Pérez & Mota (2006) “las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, la mayoría son de vida libre” (p. 26-27), pertenecen al reino procariota, su tamaño oscila entre las 0,5 y 3 μm , su forma se diferencia entre esféricas u ovaladas (cocos), cilíndricas, bastones, rectos o curvos (bacilos) y de forma espiral (espirilos).

3.9.2. Hongos

Los hongos son organismos que poseen características que son similares a la de plantas y animales, como tener un núcleo definido, ser eucariotas y heterótrofas. Los hongos poseen células alargadas que al momento de alinearse se conocen como hifas, las que al unirse forman un tipo de masa con aspecto de algodón llamado micelio. Los hongos participan en el proceso de

descomposición de materia orgánica del suelo, además han sido de vital importancia en métodos de producción de alimentos por los procesos de fermentación que pueden realizar, así como también en la medicina ya que gracias a estos organismos se pudo dar la creación de los antibióticos (Cuevas, 2016).

3.10. Siembra de microorganismos

Inocular o sembrar microorganismos es introducir de forma artificial una pequeña porción de muestra llamada inóculo, en un medio de cultivo apropiado, con la finalidad de comenzar una colonia de microorganismos, para su multiplicación y desarrollo. Al momento de la siembra se requiere trabajar de forma aséptica, con el instrumental esterilizado y manipulando los materiales únicamente cuando sea necesario. Existen diversos métodos o técnicas a la hora de llevar a cabo la siembra de los diferentes microorganismos que se deseen cultivar, estos métodos dependerán del estado, y medio utilizado, además de los requerimientos que presenten los microorganismos que se quieran estudiar (Santambrosio et al., 2009).

3.10.1. Siembra en superficie

Este método se fundamenta en verter sobre una caja Petri el medio de cultivo, una vez ahí se deja solidificar, posteriormente se coloca la muestra sobre la superficie y con la ayuda de un asa estéril o un asa de digralsky se inocula el medio extendiéndolo sobre la superficie. Se recomienda este tipo de siembra para cultivar microorganismos aerobios estrictos (Alonso & Poveda, 2008)

3.10.2. Siembra en doble capa

Este método se efectúa de forma parecida al de inmersión, sin embargo, en este se añade una capa extra de 10 ml de medio de cultivo que cubre la capa anterior. Es utilizada generalmente para microorganismos microaerófilos y facultativos (Rojas, 2011).

3.11. Aislamiento de microorganismos

Este proceso consiste en situar la descendencia de una célula, sobre el área de un medio de cultivo sólido, de manera que se la separa de los demás individuos presentes en un cultivo heterogéneo. Bajo condiciones adecuadas de crecimiento, el objetivo del aislamiento, es dar lugar a una colonia específica de microorganismos, la cual se volverá macroscópicamente visible (García et al., 2009).

3.11.1. Aislamiento por estriado o agotamiento

Es una técnica cualitativa de aislamiento de microorganismos por agotamiento en placa, a partir de un cultivo de laboratorio o de una muestra natural. Esta técnica se basa en tomar con un asa, una pequeña porción de muestra de un cultivo de microorganismos, y arrastrar en forma de zigzag por la superficie del agar nutritivo contenido en una caja Petri. El objetivo principal es conseguir, a partir de un número elevado de bacterias, un número más reducido de microorganismos sobre la superficie del medio de cultivo, para después incubar y dejar que se originen colonias (García et al., 2009).

3.12. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son aquellos que constituyen un importante aspecto a la hora de estudiar los diferentes microorganismos, ya que aportan los nutrientes indispensables para que crezcan en el laboratorio. Es necesario conocer, que, al momento de preparar y diseñar el medio de cultivo, se debe suministrar una mezcla correcta de nutrientes demandados por los microorganismos, a una concentración que optimice su desarrollo. Si se prepara de forma errónea el medio de cultivo, excediendo la concentración de nutrientes, estos pueden llegar a ser agentes

tóxicos o inhibidores, por ello es importante mantener un correcto balance de nutrientes (Latorre, 2007).

3.13. Agar Papa Dextrosa

El agar papa dextrosa (PDA), es un medio de cultivo que se utiliza para la siembra de levaduras y hongos, a partir de productos cosméticos, derivados de la leche y muestras de alimento. La composición del medio es elevadamente nutritiva, permitiendo la producción de pigmento y la esporulación. Es así que su alto contenido de carbohidratos y la infusión de la papa estimulan el crecimiento de las colonias de mohos y levaduras. Para que este medio de cultivo funcione de forma correcta, se considera un pH de aproximadamente 3,5 con una variación de $\pm 0,1$ con ácido tartárico al 10 %, de esta manera se inhibe el crecimiento de bacterias, además de adicionar Cloranfenicol en una concentración de 0,1 g/L, el cual trabajará como antibiótico (Pérez & Zárate, 2013).

3.14. Agar de soja tríptico

El agar soja tríptico, o también conocido como tripticase de soja, es un medio de cultivo básico utilizado para la siembra de diversos tipos de microorganismos, entre ellos, exigentes y no exigentes, Gram positivos, Gram negativos, levaduras y hongos. Este tipo de agar es utilizado generalmente como un medio de desarrollo inicial para observar el crecimiento de un cultivo puro, el aspecto morfológico de la colonia, además que se lo utiliza para obtener un crecimiento suficiente de microorganismos y llevar a cabo las pruebas bioquímicas adicionales de interés (Novoa, 2011).

3.15. Agar Sabouraud-Dextrosa

Este tipo de medios han sido desarrollados originalmente para la siembra de dermatofitos, hoy en día es utilizado para aislar y cultivar todo tipo de hongos. Para que este medio funcione correctamente, el agar Sabouraud-Dextrosa trabaja a un pH bajo, lo que permite inhibir el crecimiento bacteriano en su gran mayoría. Además, este medio de cultivo contiene gentamicina, que trabaja como antibiótico aminoglucósido, el cual trata diferentes tipos de infecciones bacterianas, especialmente aquellas que son causadas por microorganismos Gram negativos (Novoa, 2011).

3.16. Enzimas

Ramírez & Ayala (2014) menciona que “las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas” (p. 1). Las enzimas dentro de la célula cumplen muchas funciones entre ellas están: degradación de azúcares, sintetizan grasas y aminoácidos, además que son capaces de copiar de manera idéntica la información genética, por tal motivo a lo largo de los años de evolución se han desarrollado una gran diversidad de enzimas que tienen funciones específicas para mantener de esta manera la vida. Las enzimas no solo son capaces de funcionar internamente en las células, sino que actualmente es posible extraerlas de los organismos para poder usarlas en distintos contextos y de diferente manera. Hay varias aplicaciones tecnológicas, como producción de alimentos, medicinas, tecnologías que no serían posibles sin la utilización de enzimas, ya que son las encargadas de acelerar las reacciones que se producen en los distintos procesos (Ramírez & Ayala, 2014).

3.17. Actividad enzimática de Manganeso peroxidasa

Según Moreno & Ospina (2008) “La enzima manganeso peroxidasa es una hemo proteína que cataliza la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} dependiendo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2)” (p. 27), está ampliamente distribuida en hongos que son causantes de la pudrición blanca, además, este tipo de enzimas se han encontrado mayormente en hongos que tienen la capacidad de degradar lignina.

La enzima manganeso peroxidasa esta dentro de las enzimas ligninolíticas que son peroxidases con un grupo hemo que actúa como cofactor que usa peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones. La manganeso peroxidasa oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} , es decir, es capaz de oxidar sustratos fenólicos a través de Mn^{2+} , y compuestos no fenólicos mediante los productos de peroxidación de ácidos grasos insaturados (Montoya, 2008).

3.18. Determinación de Manganeso Peroxidasa

Para determinar la actividad enzimática de manganeso peroxidasa se han utilizado varios métodos a lo largo del tiempo, pero el más común ha sido el método de oxidación del rojo fenol. Para determinar la cantidad de enzima en U/L se usa la fórmula indicada por Chávez et al. (1990)

$$AE = \frac{\Delta Absorbancia}{\Delta t} \times \frac{1}{k} \times \frac{1}{d} \times \frac{1}{V_e} \times V_c \times dil$$

Donde:

AE: actividad enzimática expresada en UI ($\mu\text{moles.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

V_e : volumen de enzima (mL)

V_c : volumen de cubeta (mL)

dil: dilución

d: espesor de la cubeta (1 cm)

k: coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{610} 4\,460 \text{ L mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

3.18.1. Método de oxidación del rojo fenol

Este método es el más usado para la determinación de actividad enzimática de manganeso peroxidasa el cual consiste en la mezcla de varios reactivos como el rojo fenol, succinato de sodio, albúmina sérica bovina, sulfato de manganeso, peróxido de hidrógeno y el extracto enzimático para mediante un espectrofotómetro medir la absorbancia a 610 nm, una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que se requiere para oxidar 1μmol de rojo fenol por minuto (Rincón et al., 2016).

3.19. Actividad Específica

Es la actividad enzimática por la cantidad de proteína presente, sus unidades son [U/mg] (Chávez et al., 1990).

$$Act. Específica = \frac{AE}{[P]}$$

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se desarrolló en dos etapas consecutivas, la primera correspondiente a la fase de campo, en donde se tomó muestras de suelo en tres diferentes altitudes del lugar de estudio; la obtención de las muestras dio paso a la fase de laboratorio, la cual permitió realizar los respectivos análisis y pruebas necesarias para la investigación.

4.1.Fase de campo

4.1.1. Descripción del área de estudio

El páramo del volcán Chiles está ubicado entre la frontera de Ecuador y Colombia, en la provincia del Carchi, cantón Tulcán, cerca de la parroquia de Tufiño, territorio perteneciente al estado ecuatoriano. El páramo se extiende hasta los 4 723 msnm, en donde la toma de muestras de suelo se realizó a 3 600, 3 800 y 4 000 msnm en las coordenadas que fueron tomadas con un GPS (véase fotografía 1 y tablas 1,2,3).

Fotografía 1

Toma de coordenadas de los puntos de muestreo



Nota. Elaborado por Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020)

Tabla 1*Puntos de muestreo altitud 4 000 msnm*

PUNTOS DE MUESTREO	ESTE	NORTE
SUBPARCELA 1		
1	173786	88063
2	173782	88066
3	173782	88061
4	173774	88061
SUBPARCELA 2		
1	173869	88071
2	173874	88070
3	173872	88079
4	173872	88078
SUBPARCELA 3		
1	173729	88065
2	173724	88065
3	173723	88061
4	173725	88057

Nota. En la tabla se indica los puntos de muestro y sus coordenadas. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Tabla 2*Puntos de muestreo altitud 3 800 msnm*

PUNTOS DE MUESTREO	ESTE	NORTE
SUBPARCELA 1		
1	176740	88063
2	176748	87512
3	176745	87499
4	176737	87504
SUBPARCELA 2		
1	176174	87532
2	176672	87537
3	176678	87527
4	176686	87527
SUBPARCELA 3		
1	176710	87498
2	176705	87488
3	176716	87485
4	176715	87495

Nota. En la tabla se indica los puntos de muestro y sus coordenadas. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Tabla 3*Puntos de muestreo altitud 3 600 msnm*

PUNTOS DE MUESTREO	ESTE	NORTE
SUBPARCELA 1		
1	178546	86613
2	178537	86613
3	178537	86609
4	178545	86609
SUBPARCELA 2		
1	178584	86622
2	178575	86624
3	178575	86620
4	178583	86618
SUBPARCELA 3		
1	178595	86625
2	178590	86627
3	178595	86623
4	178592	86621

Nota. En la tabla se indica los puntos de muestro y sus coordenadas. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

4.2.Ubicación geográfica

En los anexos 1, 2, y 3 se puede observar la ubicación de los puntos de muestreo en el mapa, tomados en las altitudes de 3 600, 3 800 y 4 000 msnm respectivamente.

En la tabla 4 se indican los materiales que se usaron para la fase de campo.

Tabla 4

Materiales usados en la fase de campo

MATERIALES	CANTIDAD
Cooler	1
Hielo sintético	2
Cavadora manual	1
Cloro	1
Cámara fotográfica	1
GPS	1
Flexómetro	1
Fundas Ziploc	9
Fundas de basura	9

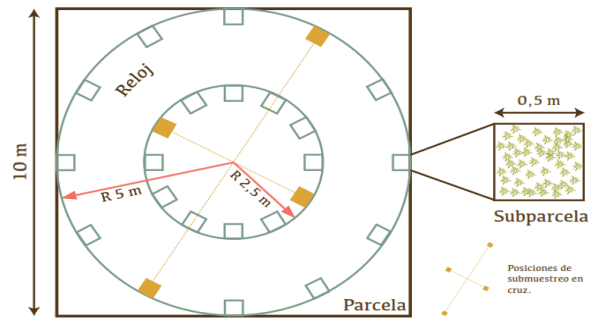
Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

4.3. Muestreo

Para la toma de muestras de suelo se siguió la metodología descrita por Calderón et al. (2013). Se consideró tres altitudes diferentes; 3 600, 3 800, 4 000 msnm, cada altitud fue delimitada por una hectárea, en cada una se estableció tres parcelas al azar. Cada parcela con una dimensión de 10 m x 10 m. Dentro de cada parcela se definió un radio #1 de 5 m y un radio #2 de 2.5 m. Con cada uno de los radios se definió una circunferencia, formando dos circunferencias por parcela. El muestreo se lo realizó tipo reloj o también conocido como submuestreo en cruz, es decir, 2 muestras en el radio #1 y dos muestras en el radio #2 teniendo 4 muestras por cada parcela como se muestra en la fotografía 2. La delimitación con el flexómetro se observa en la fotografía 3.

Fotografía 2

Diseño de muestro al azar o submuestreo en cruz



Nota: Recuperado de: Calderón, M., Romero-Saltos, H., Cuesta, F., Pinto, E., Báez, S. 2013. Monitoreo de contenidos y flujos de carbono en gradientes altitudinales. Protocolo 1 - Versión 1. CONDESAN/COSUDE: Quito, Ecuador.

Fotografía 3

Delimitación de subparcelas



Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En cada subparcela se tomó la muestra de suelo a una profundidad aproximada de 15 cm removiendo todo el material sobrante con una cavadora manual previamente desinfectada con cloro (Benavides & Hermida, 2008). Las submuestras tomadas se colocaron en una funda de basura para realizar el cuarteo y de esta manera obtener las muestras representativas que se llevaron al

laboratorio. En total fueron 9 muestras que se pusieron en fundas Ziploc completamente nuevas, se las etiquetó con el número de muestra, fecha, altitud y el nombre de quienes la tomaron.

Las muestras fueron dispuestas en un cooler para mantener la temperatura a 4°C hasta realizar los análisis en laboratorio. La guía de actividades prácticas (2015) menciona que el tiempo de almacenamiento de las muestras no puede sobrepasar el mes para que no existan cambios en la comunidad de microorganismos presentes en el suelo del páramo (véase fotografía 4).

Fotografía 4

(A) Toma de muestra de suelo, (B) Mezcla de submuestras en funda de basura, (C) Cuarteo, (D) Cooler para muestras representativas



Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020)

4.4. Fase de laboratorio

Esta etapa del estudio se lo realizó en los laboratorios de microbiología y química analítica de la Universidad Politécnica Salesiana Campus sur.

En la tabla 5 se indican los materiales que se usaron para la fase de laboratorio.

Tabla 5*Materiales usados en la fase de laboratorio*

ACTIVIDAD	MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Cultivo de microorganismos	cajas Petri asa de Digralsky mecheros Bunsen vasos de precipitación frascos boeco parafilm muestras de suelo vidrio reloj espátula	balanza analítica planchas de calentamiento autoclave cámara de flujo laminar estufa	agar PDA, SBD, TSA agua destilada alcohol al 70%
Aislamiento de microorganismos	cajas Petri asa mecheros Bunsen vasos de precipitación frascos Boeco parafilm	balanza analítica planchas de calentamiento autoclave cámara de flujo laminar estufa	agar PDA, SBD, TSA agua destilada alcohol al 70%
Obtención de extracto enzimático	matraz Erlenmeyer asa mecheros bunsen frascos boeco algodón gasas	balanza analítica autoclave Estufa agitador orbital centrifugador	agua destilada acetato de sodio
Medición de actividad enzimática	tubos de ensayo vasos de precipitación micropipetas de 10-100 y 100-1000 μ L	pH metro espectrofotómetro autoclave vertical	extracto enzimático rojo Fenol 0,1% lactato de Sodio 25 mM sulfato de manganeso 100 μ M albúmina sérica bovina 0,1% succinato de sodio 20 mM peróxido de hidrógeno 100 μ M

Nota: En la tabla se indica la actividad que se realizó, materiales, equipos y reactivos. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

4.5. Preparación de medios de cultivo

4.5.1. *Agar Papa Dextrosa*

- Se utilizó Agar Papa Dextrosa marca Difco.
- Para preparar un litro de medio de cultivo se pesó 39 g en una balanza analítica marca Metler Toledo.
- El polvo de agar pesado se colocó en un vaso de precipitación de 1 000 mL junto con el agua destilada en una plancha de calentamiento magnética, marca Velp Scientifica.
- Se dejó agitar a 350°C por aproximadamente 15 min hasta su ebullición. Se indica en la fotografía 5
- La mezcla se vertió en un frasco Boeco de 1000 mL para esterilizar en el equipo de autoclave Marca N-BIOTEK, dentro de 3 horas se puede sacar el frasco ya que es el tiempo que demora hasta que el autoclave baje de temperatura. Se indica en la fotografía 5

4.5.2. *Agar Sabouraud-Dextrosa*

- Se utilizó Agar Sabouraud-Dextrosa marca Difco.
- Para preparar un litro de medio de cultivo se pesó 65 g en una balanza analítica marca Metler Toledo.
- El polvo de agar pesado se colocó en un vaso de precipitación de 1 000 mL junto con el agua destilada en una plancha de calentamiento magnética, marca Velp Scientifica.
- Se dejó agitar a 350°C por aproximadamente 15 min hasta su ebullición. Se indica en la fotografía 5

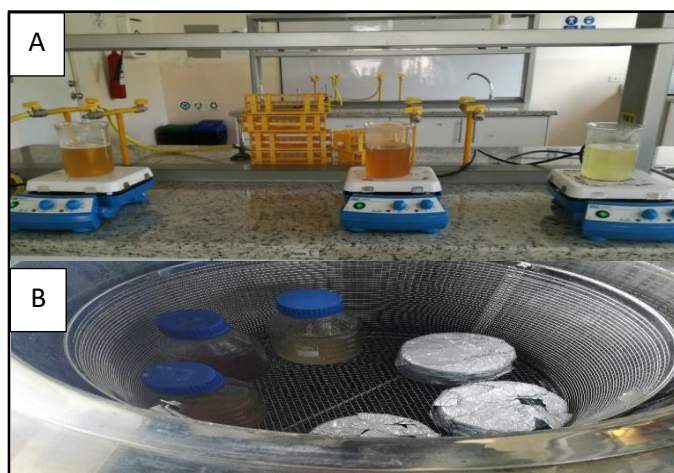
- La mezcla se vertió en un frasco Boeco de 1 000 mL para esterilizar en el equipo de autoclave Marca N-BIOTEK en 3 horas se puede sacar el frasco ya que es el tiempo que demora hasta que el autoclave baje de temperatura. Se indica en la fotografía 5.

4.5.3. *Agar Soja Trypticase*

- Se utilizó Agar Papa Dextrosa marca Difco.
- Para preparar un litro de medio de cultivo se pesó 40 g en una balanza analítica marca Metler Toledo.
- El polvo de agar pesado se colocó en un vaso de precipitación de 1 000 mL junto con el agua destilada en una plancha de calentamiento magnética, marca Velp Scientifica.
- Se dejó agitar a 350°C por aproximadamente 15 min hasta su ebullición. Se indica en la fotografía 5
- La mezcla se vertió en un frasco boeco de 1 000 mL para esterilizar en el equipo de autoclave Marca N-BIOTEK en 3 horas se puede sacar el frasco ya que es el tiempo que demora hasta que el autoclave baje de temperatura. Se indica en la fotografía 5.

Fotografía 5

(A) *Medios de cultivo en planchas de calentamiento, (B) Esterilización de los medios en el autoclave.*



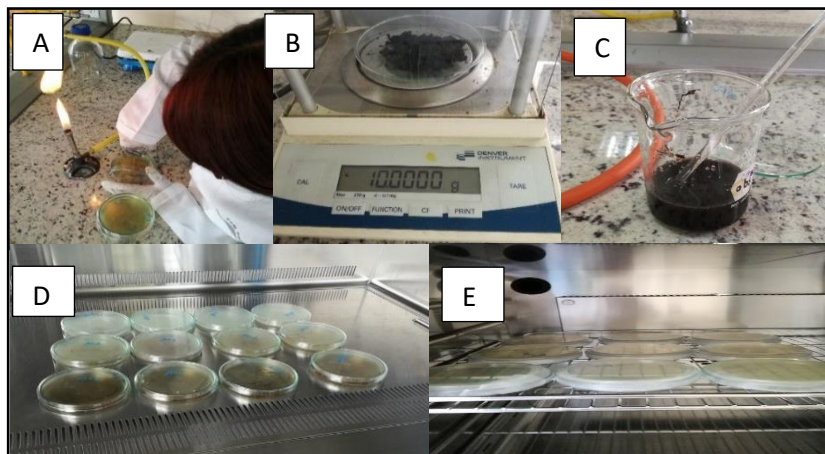
Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

4.6. Cultivo de microorganismos del suelo de páramo

- Los medios de cultivo previamente preparados fueron dispensados en cajas Petri colocando aproximadamente 25 mL en cada una, esto se lo realizó con mecheros Bunsen para evitar contaminación Véase en fotografía 6(A).
- Las cajas Petri fueron dispuestas por 10 min en la cámara de flujo laminar para la solidificación del medio de cultivo.
- Se pesó 10 g de suelo de cada submuestra para diluirla en 90 mL de agua destilada que fue previamente autoclavada para asegurar la asepsia de la misma Véase en fotografía 6(B).
- Con una micropipeta se tomó 100 μ L de esta muestra diluida y se colocó esta cantidad en cada medio de cultivo (Sabouraud, Papa Dextrosa, Soja Trypticase) para poder observar en que medio crece de mejor manera cada microorganismo presente en dicha muestra.
- Con la ayuda de un asa de Digralsky se esparció la muestra por la superficie de las cajas Petri, por razones de asepsia se lo realizó con mecheros Bunsen.

Fotografía 6

(A) Dispensación del medio de cultivo, (B) Pesaje de suelo. (C) Muestra diluida, (D) Solidificación del medio, (E) Incubación



Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

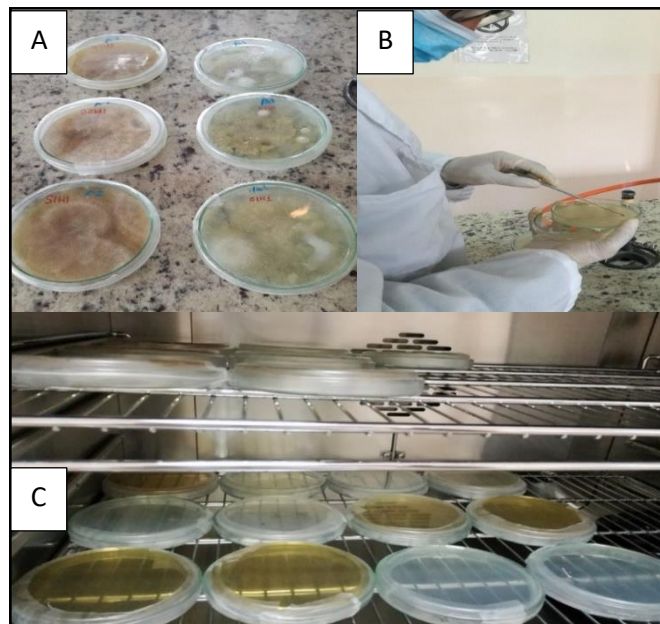
- Finalmente, las cajas Petri fueron colocadas en la incubadora marca ESCO a 25°C durante 5 días Véase en fotografía 6(E).

4.7 Aislamiento de microorganismos

- Después de 5 días de incubación las cajas Petri fueron sacadas de la incubadora observando el crecimiento de varias cepas.
- Con la ayuda de un marcador se empezó a diferenciar las cepas que crecieron en los distintos medios de cultivo para realizar el aislamiento.
- Manteniendo condiciones de asepsia con la ayuda de los Mecheros Bunsen se procedió a tomar con el asa las cepas y por punción se las colocó en las cajas Petri con los nuevos medios de cultivo preparados.
- Finalmente, estas cajas fueron colocadas en la incubadora por 5 días a 25°C para la obtención de cultivos puros.

Fotografía 7

(A) Cepas sembradas después de 5 días, (B) Aislamiento por punción, (C) Incubación



Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

4.8 Obtención de extracto enzimático

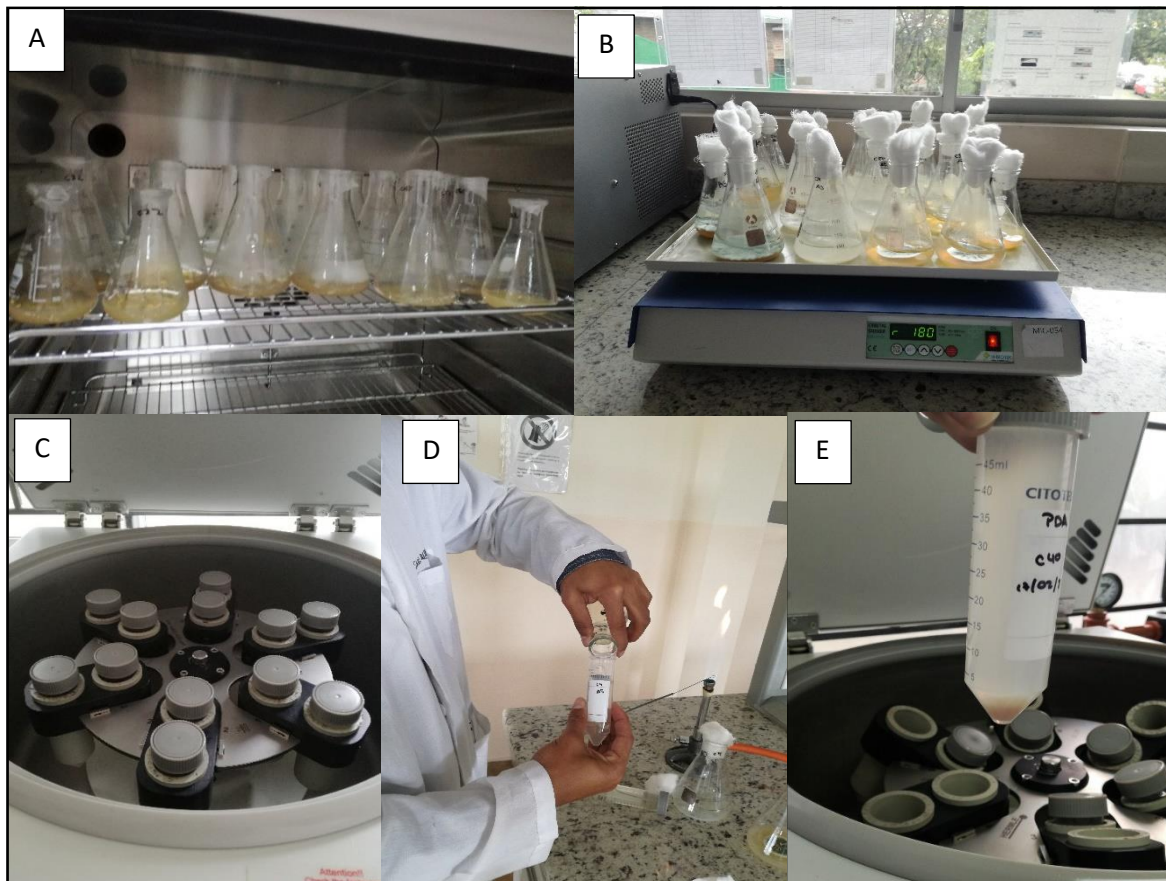
La metodología usada está descrita en Rincón et al. (2016) en donde se analizó el *Trametes polizona*, los pasos que se detallan han sido realizados con ciertas modificaciones debido a que los hongos que se aislaron en el presente estudio mostraron características distintas al *Trametes polizona*, por ende, los tiempos de agitación y de centrifugación fueron modificados, así como también el uso de acetato de sodio en lugar de agua destilada como lo indica la metodología original.

- Primero se preparó una solución de acetato de sodio a pH 4, 5 para lo cual se pesó 2,7 g de Acetato de Sodio y se diluyó en un poco de agua destilada autoclavada, seguidamente en un matraz se colocó un poco de agua destilada autoclavada y se puso 10 mL de ácido acético concentrado, se lo aforó con agua destilada en un balón a 100 mL, siendo esta preparación la solución madre.
- En un balón aforado de 1 000 mL se colocó el acetato de sodio previamente diluido y de la solución madre se colocó 38,29 mL, se homogenizó y se aforó con agua destilada autoclavada a 1 000 mL.
- Se preparó los medios de cultivo para colocar aproximadamente 25 mL de estos en matraces Erlenmeyer de 50 y 100 mL; para esterilizar los medios se realizó tapones de algodón para poder ingresar los matraces al proceso de autoclavado luego de 3 horas hasta que el equipo se enfríe se puede sacar los matraces del equipo.
- Se tomó los microorganismos aislados para sembrar en los matraces Erlenmeyer por el método de punción con la ayuda del asa y de mecheros Bunsen para evitar contaminación. Estos matraces se incubaron durante 5 días a 25°C.

- Pasados los 5 días se colocó en los matraces con los cultivos puros 50 mL de la solución de acetato de sodio.
- Seguidamente se colocaron los matraces en un agitador orbital durante 15 min a 180 rpm para que el extracto sea desprendido del agar.
- El sobrenadante se trasvasó a tubos Falcon de 50 mL.
- Los tubos Falcon fueron llevados al centrifugador por 45 min a 3 000 rpm.
- Este nuevo sobrenadante fue el extracto enzimático, el cual se colocó en tubos Falcon etiquetados con el número de cepa y la fecha.

Fotografía 8

(A) Incubación, (B) Agitación de muestras con acetato de sodio, (C) Centrifugación, (D) Producto de la centrifugación, (E) Extracto enzimático



Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

4.9. Pruebas de actividad enzimática de manganeso peroxidasa

Para la medición de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa se empleó el método de oxidación de rojo fenol por Moreno & Ospina (2008). La medición se basó en el uso de albúmina sérica bovina descrito por Ishak et al. (2018); en el que la enzima MnP se determinó con un volumen de reacción de 1 mL. En tubos de ensayo de vidrio se adicionó 700 µL de extracto enzimático, 50 µL de rojo fenol al 0,1 % , 50 µL de lactato de sodio 25 mM a un pH 4,5, 50 µL de Sulfato de Manganeso 100 µM, 50 µL de albúmina sérica bovina al 0,1 % , 50 µL de buffer succinato de sodio 20 mM a un pH 4,5, seguidamente se colocó a baño maría por 15 min a 30°C en el equipo H₂O Bath marca SHEL LAB, una vez transcurrido este tiempo la muestra fue colocada en las cubetas del equipo V-630 UV-Vis Spectrophotometer from JASCO, finalmente se colocó 50 µL de peróxido de hidrógeno 100 µM para iniciar la reacción, la curva de absorbancia vs tiempo fue medida durante 1 min con intervalos de 5 segundos con el software Spectra Manager (véase en anexo 11) a una longitud de onda de 610 nm (ϵ_{610} 4 460 L /mol.cm) se utilizó como blanco todos los reactivos anteriores excepto el peróxido de hidrógeno que se reemplazó por 50 µL de extracto enzimático como lo indica Kuwahara et al. (1983). La unidad de MnP está definida como una µmol de rojo fenol oxidado por minuto. U/L de MnP se calculan utilizando la ecuación 1 (Chávez et al., 1990) (Véase preparación de reactivos en anexo 15)

Ecuación 1. Actividad enzimática

$$AE = \frac{\Delta Absorbancia}{\Delta t} \times \frac{1}{k} \times \frac{1}{d} \times \frac{1}{Ve} \times Vc \times dil$$

Donde:

AE: actividad enzimática expresada en UI (µmoles.L⁻¹.min⁻¹)

Ve: volumen de enzima (mL)

Vc: volumen de cubeta (mL)

dil: dilución

d: espesor de la cubeta (1 cm)

k: coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{610} 4\,460 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Fotografía 9

(A) Reactivos, (B) Preparación de la muestra, (C) Colocación en baño maría, (D) Adición de H_2O_2 , (E) Medición en el espectrofotómetro



Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020)

4.10. Medición de la actividad específica

- Para conocer la actividad específica se aplicó la ecuación 2 (Chávez et al., 1990).

Ecuación 2 Actividad específica

$$Act. Específica = \frac{AE}{[P]}$$

Donde:

[P] = concentración de proteína

AE = Actividad enzimática

- El valor de concentración de proteína [P] se lo calculó midiendo la absorbancia de los extractos enzimáticos con una longitud de onda de 280 nm, se usa un coeficiente de extinción arbitrario, en el caso de que el valor de absorbancia sobrepase el 1 se debe realizar diluciones, la ecuación 3 para calcular es la siguiente (Chávez et al., 1990).

Ecuación 3 Cálculo de proteína

$$[P] = DO_{280} \times \frac{F}{L \times E}$$

Donde:

[P] = concentración de proteína

DO₂₈₀= absorbancia medida a 280 nm

F= factor de dilución

L = longitud de la celda

E= Coeficiente de extinción (1)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todo el proceso de investigación se tomaron 9 submuestras que fueron recolectadas en el páramo del Volcán Chiles ubicado en la parroquia Tufiño en las altitudes de 3 600, 3 800 y 4 000 msnm, el número de cepas que se aislaron se encuentran resumidos en la tabla 6 que se indica a continuación.

Tabla 6

Número de cepas aisladas por altitud

ALTITUD (msnm)	N.- DE CEPAS AISLADAS
3 600	21
3 800	17
4 000	18
TOTAL	56

Nota: En la tabla se indica la altitud y el número de cepas aisladas por cada altitud. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Dentro de las 9 submuestras que fueron tomadas se aislaron 56 cepas, se obtuvieron 21 cepas a la altitud de 3 600 msnm, 17 cepas en la altitud de 3 800 msnm, y 18 cepas en la altitud 4 000 msnm.




5.1. Cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm





En la tabla 7 se indica las cepas que crecieron tanto en Agar PDA, SBD y TSA, y las características macroscópicas como criterio para el aislamiento de las cepas. En el código de cepa se detalla el tipo de agar con las siguientes abreviaturas SB (Sabouraud), PDA (Patata dextrosa) y





TSA (Soja tripticase), la altitud y la submuestra abreviada como S con su respectivo número, finalmente se colocó el número de cepa.


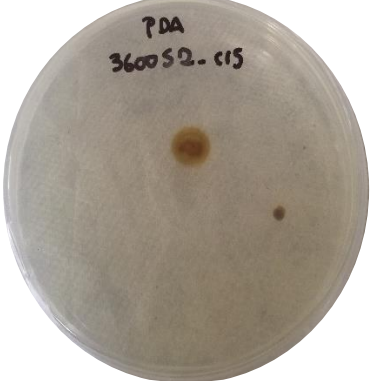


Tabla 7




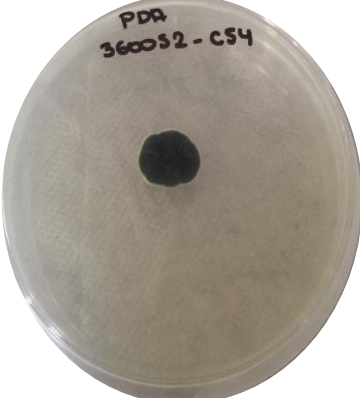
Cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm



Código de cepa	Fotografía	Características	Agar en que se desarrolló
SB-3600-S1-C1		Colonia con crecimiento irregular, posee una textura líquida de color rosado.	SBD
PDA-3600-S1-C4		Colonia circular de color café oscuro, posee textura lanosa, presenta estrías en el centro.	PDA
SB-3600-S2-C5		Colonia circular de color café oscuro, posee una textura algodonosa, no presenta estrías, crecimiento uniforme.	SBD

PDA-3600-S2-C6		Colonia circular de color blanco, posee una textura algodonosa aterciopelada, presenta estrías en forma de estrella.	PDA
SB-3600-S2-C7		Colonia circular de color crema con textura algodonosa y presenta estrías de forma irregular.	SBD
SB-3600-S2-C8		Colonia circular de color crema con textura algodonosa, no presenta estrías notorias.	SBD
SB-3600-S3-C9		Colonia circular de color café oscuro y en el centro color crema, posee una textura lanosa.	SBD

SB-3600-S3-C10		Colonia circular de color café oscuro en el centro y en los bordes color crema, posee una textura lanosa.	SBD
SB-3600-S3-C11		Colonia circular de color café oscuro, con textura algodonosa, no posee estrías ni formación de anillos.	SBD
PDA-3600-S1-C12		Colonia circular irregular de color crema, con hifas grises, textura algodonosa.	PDA
PDA-3600-S1-C13		Colonia de forma irregular con una mezcla de negro y crema, posee una textura viscosa.	PDA

PDA-3600-S1-C14		Colonia de forma redonda, posee un color café claro, no presenta estrías, una leve formación de un anillo de color café oscuro, textura lanosa.	PDA
PDA-3600-S2-C15		Colonia de forma circular, pequeña, de color café oscuro en el centro y café claro alrededor, textura viscosa.	PDA
PDA-3600-S2-C17		Colonia irregular de color café oscuro en el centro, anillos café claro, borde color crema, textura cremosa.	PDA
PDA-3600-S2-C18		Colonia circular de color crema, en el centro presenta un color café oscuro, formación de un anillo, textura cremosa.	PDA

PDA-3600-S3-C19		Colonia circular de color gris, con textura lanosa, hifas de color gris, en el centro presenta una textura viscosa de color negro, presencia de anillos.	PDA
PDA-3600-S3-C20		Colonia de forma irregular de color crema con un centro amarillo oscuro, posee anillos y una textura cremosa.	PDA
PDA-3600-S3-C21		Colonia de forma redonda, textura lanosa de color café oscuro o negro en el centro, en los bordes se puede observar el micelio en forma de lanas.	PDA
PDA-3600-S2-C54		Colonia de forma irregular de color negro presenta una textura sólida, su micelio es compacto.	PDA

SB-3600-S2-C55		Colonia de forma irregular, de color blanco con textura algodonosa, presenta estrías.	SBD
SB-3600-S2-C56		Colonia de forma redonda de color café oscuro con bordes más claros, textura algodonosa.	SBD


Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).


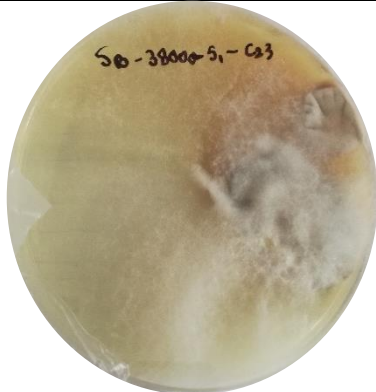


5.2. Cepas aisladas en la altitud 3 800 msnm

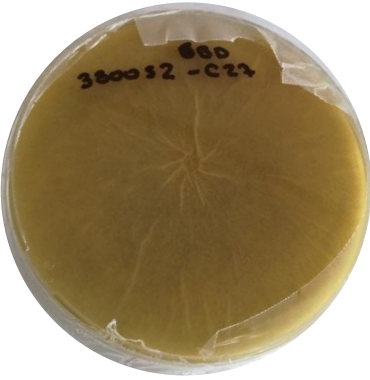

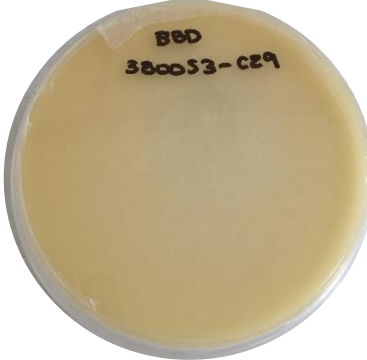

En la tabla 8 se muestra las cepas que crecieron tanto en Agar PDA, SBD y TSA, y las características macroscópicas como criterio para el aislamiento de las cepas.


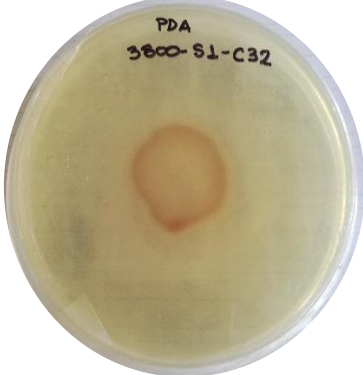
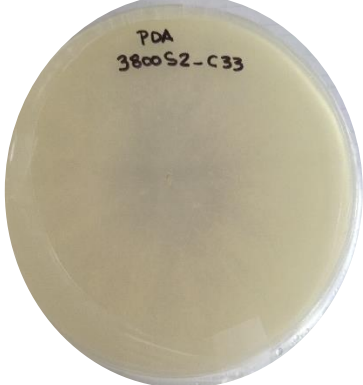

Tabla 8

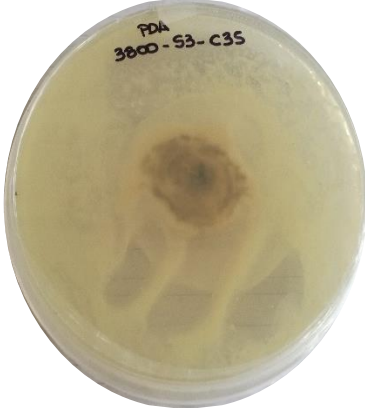

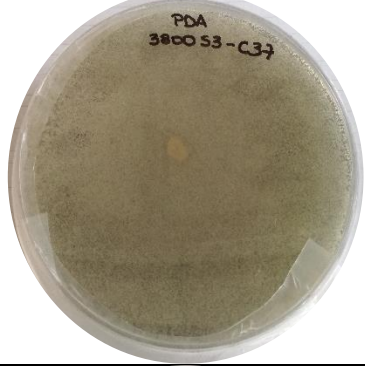

Cepas aisladas en la altitud 3 800 msnm.

Código de cepa	Fotografía	Características	Agar en que se desarrolló
SB-3800-S3-C2		Colonia de forma irregular con bordes color crema rosáceo y textura viscosa, mientras que el centro es de color crema con textura algodonosa.	SBD

SB-3800-S1-C22		Colonias de forma oval de color verde oscuro, posee un micelio compacto con textura polvorienta algodonosa y bordes de color blanco.	SBD
SB-3800-S1-C23		Colonia con forma irregular de color crema y tomate con textura viscosa, rodeada de una textura lanosa de color blanco.	SBD
SB-3800-S1-C25		Colonia con forma irregular de color verde limón con textura algodonosa y de color blanca en la superficie.	SBD
SB-3800-S1-C26		Colonia irregular de color verde oscuro con margen ancho de color blanco, posee una superficie pulverulenta y un micelio duro.	SBD

SB-3800-S2-C27		Colonia de color café oscuro con micelio compacto, textura polvorienta algodonosa con estrías en el centro.	SBD
SB-3800-S2-C28		Colonia de forma redonda con anillos de colores café oscuro y color crema en el medio, textura algodonosa.	SBD
SB-3800-S3-C29		Colonia de forma redonda de color crema tomate, con una textura viscosa.	SBD
SB-3800-S3-C30		Colonia de forma redonda de color blanco es de textura algodonosa.	SBD

PDA-3800-S1-C31		Colonia de color plomo con bordes blancos es de forma redonda, tiene una leve presencia de anillos, es de textura algodonosa.	PDA
PDA-3800-S1-C32		Colonia de forma irregular con centro de color crema y borde tomate, alrededor de color crema con textura cremosa.	PDA
PDA-3800-S2-C33		Colonia de forma redonda de color crema, posee estrías, tiene textura algodonosa.	PDA
PDA-3800-S2-C34		Colonia de forma redonda con los bordes cremas, formación de anillos con colores cafés oscuros y grises, textura algodonosa.	PDA

PDA-3800-S3-C35		Colonia de forma irregular con el centro de color café oscuro y alrededor de color crema con textura viscosa.	PDA
PDA-3800-S3-C36		Colonia de forma irregular con color crema y tomate de textura viscosa.	PDA
PDA-3800-S3-C37		Colonia de forma redonda de color gris, no presenta estrías, textura lanosa.	PDA
SB-3800-S1-C53		Colonia de forma irregular de color rosado con presencia de estrías que salen de la parte superior, es de textura algodonosa.	SBD



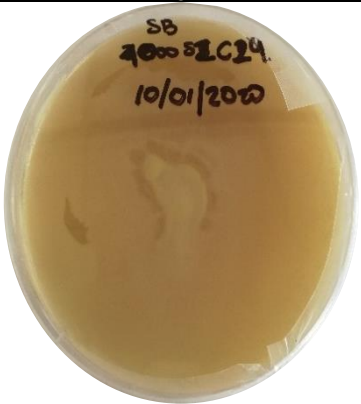
Nota. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020)

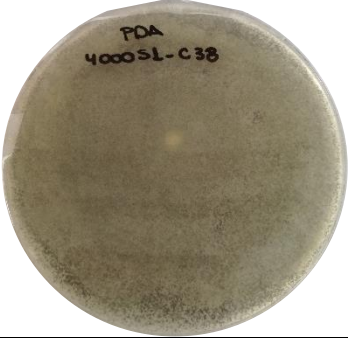


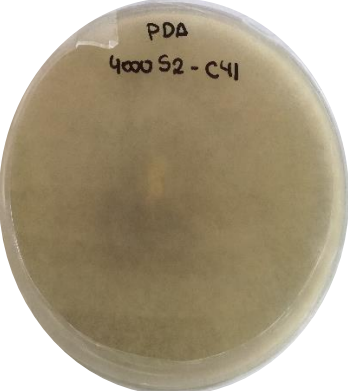
5.3. Cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm

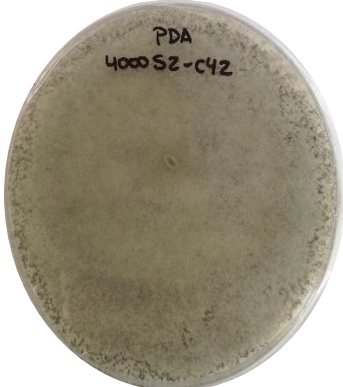



En la tabla 9 se observa las cepas que crecieron tanto en Agar PDA, SBD y TSA, y las características macroscópicas como criterio para el aislamiento de las cepas.


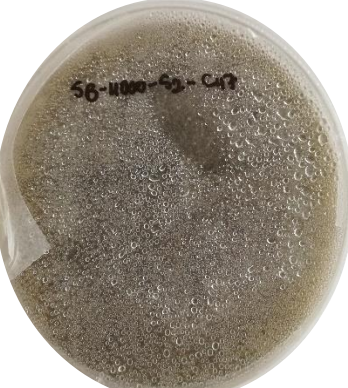
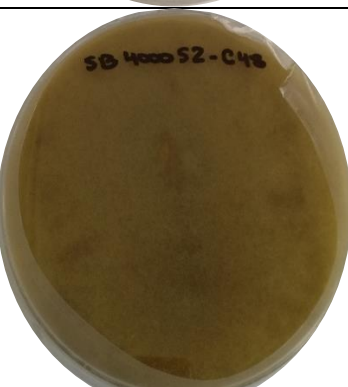

Tabla 9




Cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm

Código de cepa	Fotografía	Características	Agar en que se desarrolló
TSA-4000-S1-C15		Colonias de color blanco de una textura algodonosa, forma oval.	TSA
TSA-4000-S1-C16		Colonias de forma irregular de color blanco, posee una textura algodonosa.	TSA
SB-4000-S1-C24		Colonia de forma irregular posee una textura viscosa, es de color crema rosáceo.	SBD

PDA-4000-S1-C38		Colonia de forma redonda de color gris con el centro de color crema, textura algodonosa.	PDA
PDA-4000-S1-C39		Colonia redonda con presencia de dos anillos el del centro de color crema y el externo de color gris, posee una textura lanosa.	PDA
PDA-4000-S1-C40		Colonia de forma irregular con presencia de anillos de color gris y crema, posee una textura viscosa en el centro y lanosa en los extremos.	PDA
PDA-4000-S2-C41		Colonia de forma redonda de color café oscuro, posee una textura algodonosa.	PDA

PDA-4000-S2-C42		Colonia de forma redonda de color gris, presenta un anillo en el medio de color crema, es de textura lanosa.	PDA
PDA-4000-S3-C43		Colonia de forma irregular con el centro de forma redonda color tomate y bordes cremas, es de textura cremosa.	PDA
PDA-4000-S3-C44		Colonia de forma irregular de color crema, posee una textura cremosa.	PDA
SB-4000-S1-C45		Colonia con presencia de anillos de color café oscuro y crema, posee una textura algodonosa aterciopelada.	SBD

SB-4000-S1-C46		Colonia de forma irregular con una mezcla de color café oscuro y crema, posee una textura algodonosa aterciopelada.	SBD
SB-4000-S2-C47		Colonia de forma circular con color café plomizo, presenta una textura lanosa.	SBD
SB-4000-S2-C48		Colonia de color café oscuro, es de forma redonda, y posee una textura algodonosa.	SBD
SB-4000-S3-C49		Colonia de forma irregular de color blanco con borde de color naranja, tiene una textura viscosa.	SBD

SB-4000-S3-C50		Colonia de forma irregular color blanco con formación de segmentos, presenta una textura sólida y de micelio compacto.	SBD
SB-4000-S3-C51		Colonias de forma irregular con micelio compacto de color negro verdoso, con textura polvorienta.	SBD
SB-4000-S3-C52		Colonias de forma irregular con apariencia de nube, color blanco de textura algodonosa.	SBD

Nota. La descripción de las características de las cepas se lo realizó utilizando lo mencionado por Pacasa, Loza, Flores, Vino, & Serrano (2017) y Arias & Piñeros (2008). Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

5.4. Actividad enzimática de Manganese Peroxidasa.

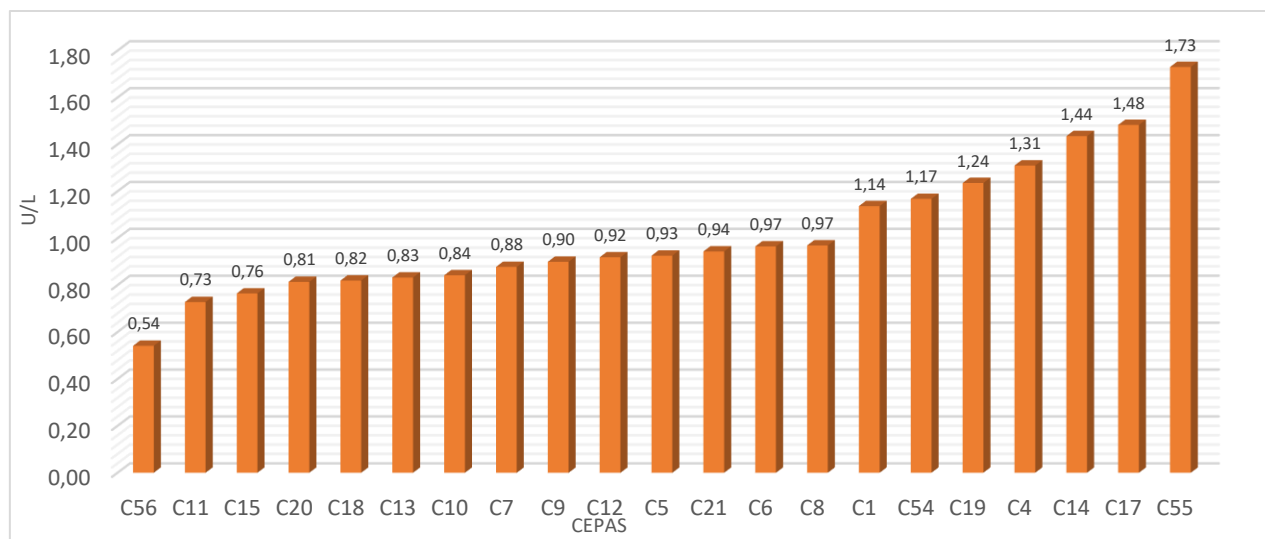
Los códigos que se utilizaron para los microorganismos aislados fueron Agar-Altitud-Submuestra-Cepa, para este apartado de resultados de actividad enzimática se usa únicamente el código de la cepa es decir C con su respectivo número.

5.4.1. Actividad enzimática en la altitud 3 600 msnm

En el gráfico 1 se indica los valores que se obtuvieron de actividad enzimática de manganeso peroxidasa a una altitud de 3 600 msnm. Se puede observar que el rango de actividades va de 0,54 U/L en la C56 a 1,73 U/L en la C55.

Gráfico 1

Actividad Enzimática (MnP) Altitud 3 600 msnm



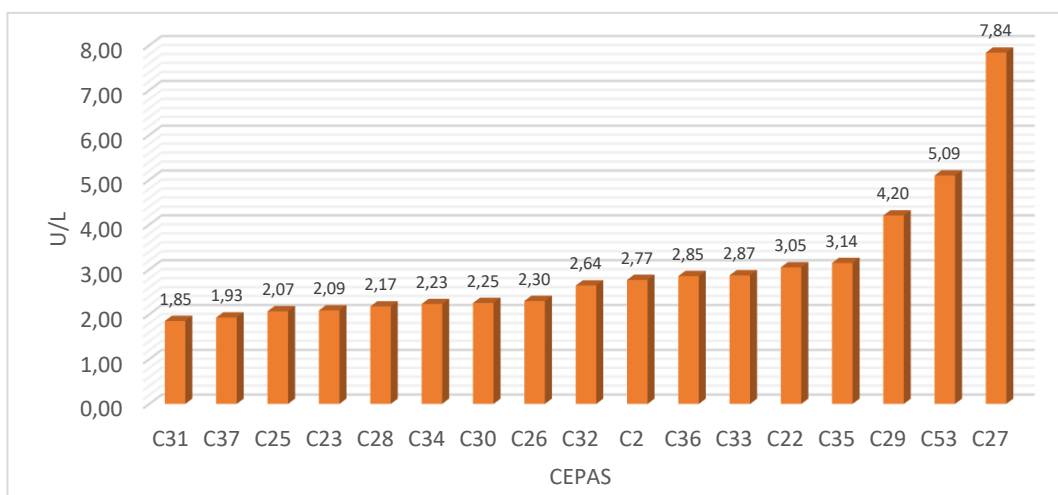
Nota. La gráfica muestra las cepas aisladas a una altitud de 3 600 msnm con su respectivo valor de actividad enzimática en el eje Y mientras que en el eje X se muestra las cepas. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

5.4.2. Actividad enzimática en la altitud 3 800 msnm

En el gráfico 2 se indica los valores que se obtuvieron de actividad enzimática de manganeso peroxidasa a una altitud de 3 800 msnm, se puede observar que el rango de actividades va de 1,85 U/L en la C31 a 7,84 U/L en C27.

Gráfico 2

Actividad Enzimática (MnP) Altitud 3 800 msnm



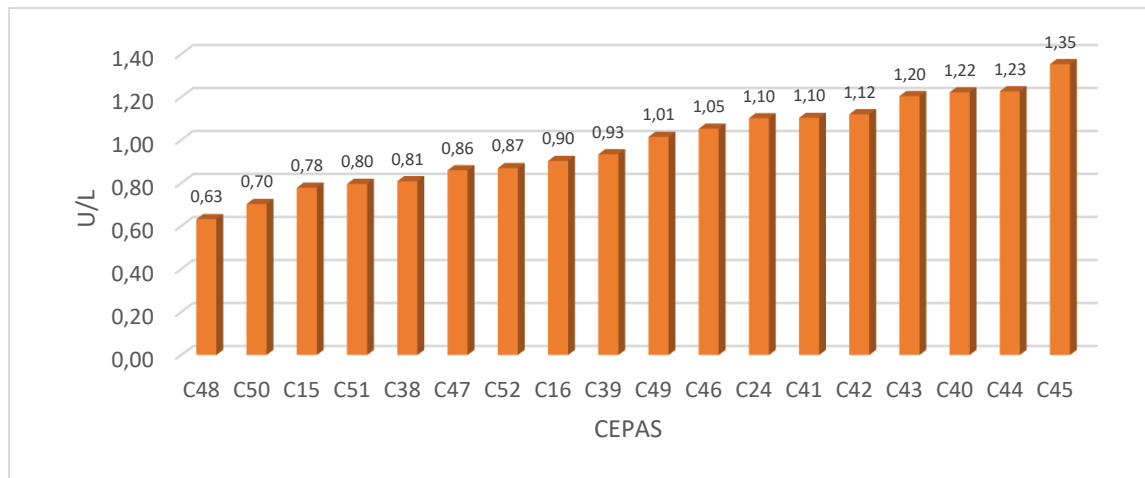
Nota. La gráfica muestra las cepas aisladas a una altitud de 3 800 msnm con su respectivo valor de actividad enzimática en el eje Y mientras que en el eje X se muestra las cepas. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

5.4.3. Actividad enzimática en la altitud 4 000 msnm

En el gráfico 3 se indica los valores que se obtuvieron de actividad enzimática de manganeso peroxidasa a una altitud de 4 000 msnm, se puede observar que el rango de actividades va de 0,63 U/L en C38 a 1,35 U/L en C45.

Gráfico 3

Actividad Enzimática (MnP) Altitud 4 000 msnm



Nota. La gráfica muestra las cepas aisladas a una altitud de 4 000 msnm con su respectivo valor de actividad enzimática en el eje Y mientras que en el eje X se muestra las cepas. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

5.5. Análisis Estadístico de actividad enzimática manganeso peroxidasa con respecto a la altitud.

Para el análisis estadístico de este estudio se usó un paquete estadístico con el que se pudo realizar los análisis de varianza, la prueba de Tukey que permitió conocer los grupos en donde existen diferencias estadísticas significativas. Se usó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov útil para muestras mayores a 50 datos y corroborar que los mismos se encuentran en una distribución normal.

En la tabla 10 se indica los resultados de la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, en donde el valor de significancia es de 0,200 el cual indica que los datos son normales ($p > 0.05$), demostrando que se pueden tratar en un modelo de análisis de varianza.

Tabla 10*Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov*

	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico (Z)	Grados de libertad	Significancia(p)
U/L	0,098	56	0,200

Nota: La tabla muestra el valor estadístico (Z), grados de libertad y la significancia de los datos Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En el ANOVA de la tabla 11 se indica el efecto de la actividad enzimática manganeso peroxidasa con respecto a la altitud observándose que el valor de significancia es menor a 0,05 lo que indica que si hay diferencias significativas en las medias de actividad enzimática por cada altitud.

Tabla 11*Análisis de varianza para la presencia de actividad enzimática manganeso peroxidasa por altitud.*

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Fisher	Significancia
Inter-grupos	48,30901091	2	24,15450546	33,40589278	0,000000000410
Intra-grupos	38,32224444	53	0,723061216		
Total	86,63125536	55			

Nota: La tabla muestra la suma de cuadrado, grados de libertad, media cuadrática, distribución de Fisher y la significancia para la altitud. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 12 se indica la prueba de Tukey, aquí se muestra los grupos con diferencias estadísticas significativas, estas diferencias significativas se dan entre las medias de actividad enzimática MnP del grupo de cepas pertenecientes a la altitud 3 800 msnm y 4 000 msnm; y también 3 600 msnm y 3 800 msnm.

Tabla 12*Método de agrupación de Tukey*

	ALTITUD	N	Subconjunto para alfa = .05	
			1	2
HSD de Tukey(a,b)	4000	18	A	
	3600	21	A	
	3800	17		B

Nota: La tabla muestra el número de muestras por altitud y los subconjuntos formados por las diferencias significativas presentadas en sus medias. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 13, se muestran las medias de actividad enzimática de manganeso peroxidasa por cada altitud, teniendo una media de 1,02 U/L en la altitud 3 600 msnm, 3,02 U/L en la altitud 3 800 msnm y 0,98 U/L en la altitud 4 000 msnm. Las medias de la actividad enzimática de las altitudes de 3600 y 4000 msnm son estadísticamente iguales, mientras que la altitud de 3800 msnm es diferente a ambas.

Tabla 13*Análisis estadístico descriptivo de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por altitud*

ALTITUD	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Grupos TUKEY
					Límite inferior	Límite superior			
3600	21	1,02	0,29	0,06	0,89	1,15	0,54	1,73	A
3800	17	3,02	1,50	0,36	2,25	3,79	1,85	7,84	B
4000	18	0,98	0,20	0,05	0,88	1,08	0,63	1,35	A

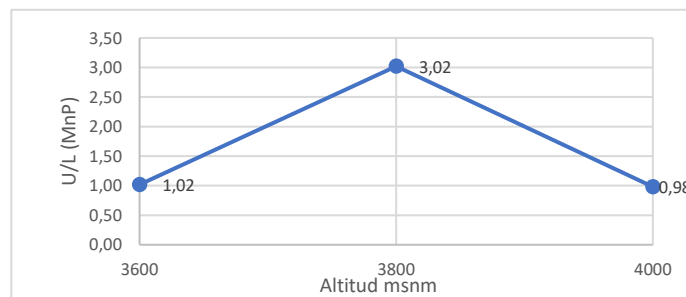
Nota: La tabla muestra el número de muestras, las medias, desviación típica, error típico, los límites superior e inferior, el valor mínimo, máximo y los grupos Tukey con respecto a la altitud. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En el gráfico 4 se muestra una comparación entre las medias a las distintas altitudes, teniendo en la altitud 3 800 msnm una media de actividad enzimática manganeso peroxidasa de 3,02 U/L, es decir que existe una mayor actividad enzimática a esta altitud, Benavides & Hermida (2008) en su estudio mencionan que a una altitud entre 3 000-3 800 msnm existen condiciones de

humedad y pH óptimos para que los microorganismos que pueden producir enzimas peroxidasas, además, que la presencia de biomasa es otro factor importante. En el lugar de estudio a la altitud de 3 800 msnm es en donde hubo mayor cantidad de biomasa por ende no había abundante humedad en el suelo (Cárdenas, 2015).

Gráfico 4

Gráfica de las medias de actividad enzimática manganeso peroxidasa por altitud



Nota: La gráfica muestra las medias de actividad enzimática de manganeso peroxidasa en cada altitud muestreada. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

A pesar de que el suelo de páramo presenta una gran variedad microbiana no se han realizado estudios para analizar la presencia de actividad manganeso peroxidasa en los microorganismos que crecen a las condiciones del páramo. Una vez realizados los análisis se tuvo como resultado que todos los microorganismos aislados presentaron actividad enzimática de manganeso peroxidasa en un rango de 0,54 U/L hasta un máximo de 7,4 U/L. En el estudio realizado por Gil, Manjarres, Piñeros, & Rodríguez (2012) analizaron la influencia de adicionar nitrógeno para poder producir la enzima y obtuvieron valores de actividad enzimática de manganeso peroxidasa que va de $4,10 \pm 1,95$ hasta $10,19 \pm 0,056$ U/L con una cantidad de nitrógeno de 1,12 %. En los suelos de páramo el porcentaje de nitrógeno total está en un promedio de 0,57% como menciona Cárdenas (2015) por este motivo los valores de actividad enzimática de MnP de este estudio se asemejan al de Gil, et al. (2012) ya que al ser suelo de páramo tiene el nitrógeno de manera natural; a diferencia del estudio realizado por Córdoba & Cultid (2015) en donde se analizó

la presencia de actividad enzimática en el hongo *Pleurotus ostreatus* que es un macromiceto que crece en bosques subtropicales teniendo resultados de actividad enzimática que va desde $3,535 \pm 1,641$ hasta $83,873 \pm 1,989$ U/L que resultan mayores a los del estudio que se realizó. El hongo fue incubado en un rango de 25-28 °C por 15 o 29 días a diferencia de los microorganismos aislados en este estudio que fueron incubados por 5 días a 25 °C. Además las condiciones de los ecosistemas son distintos ya que los bosques subtropicales se caracterizan por tener árboles con hojas anchas y verdes y temperaturas que oscilan entre los 25-28 °C como menciona Sánchez, Gavilán, & Vignale (2018) a diferencia del páramo que presenta árboles enanos con protección del frío como lo son los frailejones y temperaturas que van de los 2 a 10 °C (Camacho, 2013).

5.6. Actividad específica

Se realizaron los cálculos de actividad específica para conocer cuántas unidades de enzima manganeso peroxidasa están por mg de proteína del extracto enzimático; cabe mencionar que es importante medir el valor de proteína para conocer si el resultado obtenido de actividad enzimática es manganeso peroxidasa o pueden ser otro tipo de enzima.

5.6.1. Actividad específica en la altitud 3 600 msnm

En la Tabla 14 se indica los valores de actividad específica por cada cepa de la altitud 3 600 msnm, el valor fue calculado con la división entre la actividad enzimática y el valor de proteína.

Tabla 14

Actividad específica en la altitud 3 600 msnm.

CEPAS	AE (U/L)	PROTEÍNA (mg/L)	Act. Específica (U/mg de proteína)
C1	1,14	2,377	0,48
C4	1,31	2,059	0,64
C5	0,93	1,347	0,69
C6	0,97	1,008	0,96

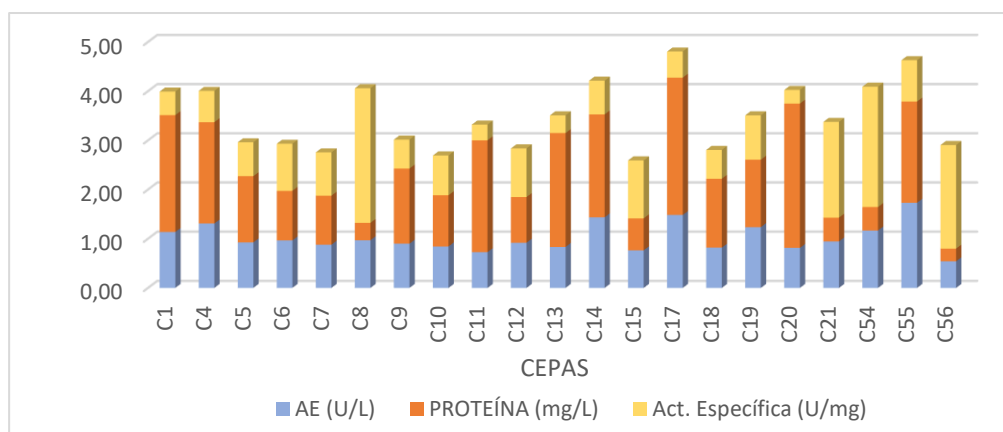
C7	0,88	0,997	0,88
C8	0,97	0,354	2,74
C9	0,90	1,526	0,59
C10	0,84	1,043	0,81
C11	0,73	2,272	0,32
C12	0,92	0,928	0,99
C13	0,83	2,315	0,36
C14	1,44	2,091	0,69
C15	0,76	0,649	1,18
C17	1,48	2,791	0,53
C18	0,82	1,399	0,59
C19	1,24	1,371	0,90
C20	0,81	2,933	0,28
C21	0,94	0,485	1,95
C54	1,17	0,477	2,45
C55	1,73	2,059	0,84
C56	0,54	0,257	2,11

Nota: La tabla muestra el número de las cepas, actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en la altitud 3 600 msnm. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En el gráfico 5 se indica de distintos colores la actividad enzimática, la proteína y la actividad específica. La cepa 17 tuvo un valor de actividad enzimática de 1,48 U/L y de proteína un valor mayor de 2,791 mg/L, lo que quiere decir que hay otras enzimas que no son específicamente manganeso peroxidasa, por este motivo el valor de actividad específica es de 0,53 U/ mg de proteína.

Gráfico 5

Actividad específica en la altitud 3 600 msnm.



Nota: La gráfica muestra Actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en 3 600 msnm. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

5.6.2. Actividad específica en la altitud 3 800 msnm

En la tabla 15 se indica los valores de actividad específica por cada cepa de la altitud 3 800 msnm, el valor fue calculado con la división entre la actividad enzimática y el valor de proteína.

Tabla 15

Actividad específica en la altitud 3 800 msnm.

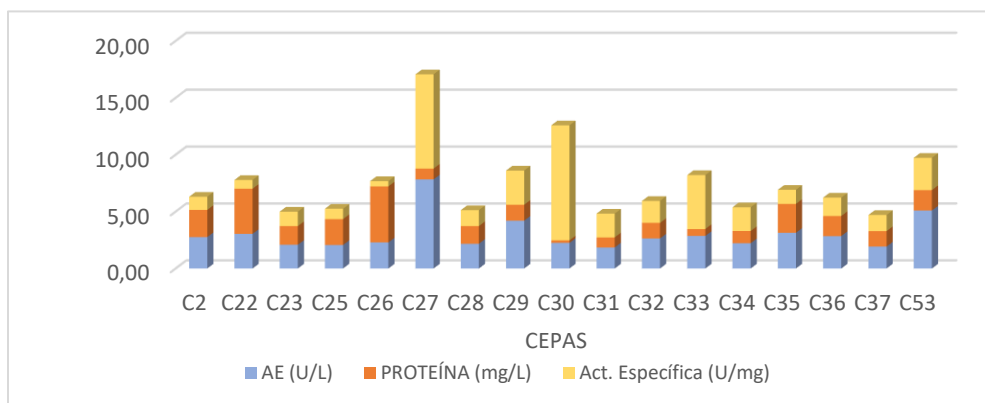
CEPAS	AE (U/L)	PROTEÍNA (mg/L)	Act. Específica (U/mg)
C2	2,77	2,385	1,16
C22	3,05	3,965	0,77
C23	2,09	1,640	1,27
C25	2,07	2,280	0,91
C26	2,30	4,920	0,47
C27	7,84	0,946	8,29
C28	2,17	1,554	1,40
C29	4,20	1,399	3,00
C30	2,25	0,223	10,11
C31	1,85	0,884	2,09
C32	2,64	1,369	1,93
C33	2,87	0,605	4,74
C34	2,23	1,066	2,09
C35	3,14	2,534	1,24
C36	2,85	1,764	1,62
C37	1,93	1,356	1,42
C53	5,09	1,795	2,84

Nota: La tabla muestra el número de las cepas, actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en la altitud 3 800. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En el gráfico 6 se indica de distintos colores la actividad enzimática, la proteína y la actividad específica, en el caso de la cepa 27 que tiene un valor de actividad enzimática de 7,84 U/L y un valor de proteína de 0,946 mg/L lo que significa que toda la proteína leída es enzima manganeso peroxidasa, por tal razón el valor de actividad específica es de 8,29 U/mg de proteína.

Gráfico 6

Actividad específica en la altitud 3 800 msnm.



Nota: La gráfica muestra Actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en 3 800 msnm. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

5.6.3. Actividad específica en la altitud 4 000 msnm

En la tabla 16 se indica los valores de actividad específica por cada cepa de la altitud 4 000 msnm, el valor fue calculado con la división entre la actividad enzimática y el valor de proteína.

Tabla 16

Actividad específica en la altitud 4 000 msnm.

CEPAS	AE (U/L)	PROTEÍNA (mg/L)	Act. Específica (U/mg)
C15	0,78	0,131	5,96
C16	0,90	0,274	3,30
C24	1,10	1,295	0,85
C38	0,81	1,074	0,75
C39	0,93	0,823	1,13
C40	1,22	0,770	1,59
C41	1,10	0,520	2,12
C42	1,12	0,433	2,58
C43	1,20	0,604	1,99
C44	1,23	0,285	4,31
C45	1,35	2,016	0,67

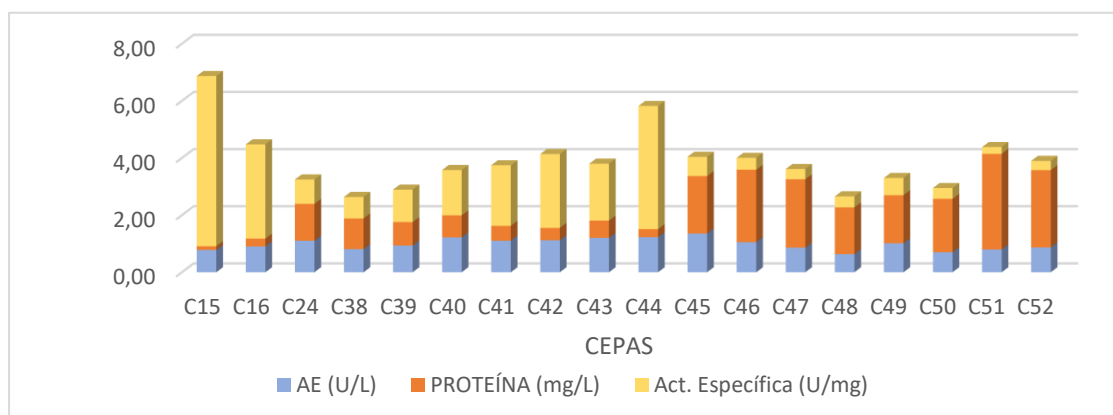
C46	1,05	2,536	0,42
C47	0,86	2,397	0,36
C48	0,63	1,637	0,39
C49	1,01	1,682	0,60
C50	0,70	1,870	0,38
C51	0,80	3,348	0,24
C52	0,87	2,706	0,32

Nota: La tabla muestra el número de las cepas, actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en la altitud 4 000. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En el gráfico 7 se indica de distintos colores la actividad enzimática, la proteína y la actividad específica en el caso de la cepa C44 se tiene un valor de actividad enzimática de 1,23 U/L y 0,285 mg/L de proteína lo que significa que toda la proteína leída es la enzima manganeso peroxidasa.

Gráfico 7

Actividad específica en la altitud 4 000 msnm.



Nota: La gráfica muestra Actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica en 4 000 msnm. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En el estudio realizado por Chan, Heredia, & Rodríguez (2015) en donde se analizó la actividad de varios macromicetos que fueron incubados por 12 días a 22° C presentando valores de actividad específica que van de 15 U/mg de proteína hasta 450 U/mg de proteína es decir son mayores a los valores de actividad específica de los microorganismos del páramo del Volcán Chiles

que están en un rango desde 0,32 hasta 10,11 U/mg de proteína, esto puede deberse a varios factores: el método usado por Chan, et al. (2015) para la medición de actividad enzimática fue cualitativo por tanto los resultados pueden ser sobrestimados, además que los macromicetos fueron de otro ecosistema que no es el páramo.

5.7. Microorganismos con mayor actividad de manganeso peroxidasa como indicadores del potencial de biodegradación de plástico polietileno (PE)

5.7.1. Análisis estadístico para seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática en la altitud 3 600 msnm.

En la tabla 17 se puede observar que el valor de significancia es menor al 5% demostrando que hay diferencias estadísticas significativas en las medias de actividad enzimática con respecto a las cepas analizadas.

Tabla 17

Análisis de Varianza de actividad enzimática por cepas aisladas altitud 3 600 msnm

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media cuadrática	Fisher	Significancia
Inter-grupos	4,95668074	20	0,24783404	141,803997	3,53025E-32
Intra-grupos	0,07340435	42	0,00174772		
Total	5,03008509	62			

Nota: La tabla muestra la suma de cuadrados, grados de libertad, media cuadrática, distribución Fisher y la significancia de actividad enzimática con respecto a las cepas de la altitud 3 600 msnm. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 18 se indica la prueba de Tukey en donde se indica los grupos con diferencias estadísticas significativas, los cuales se agruparon de la siguiente manera:

Tabla 18

Método de agrupación de Tukey de actividad enzimática por cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = .05
-------	---	-----------------------------

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C56	3	A									
C11	3		B								
C15	3		B	C							
C20	3		B	C	D						
C18	3		B	C	D						
C13	3		B	C	D						
C10	3		B	C	D	E					
C7	3			C	D	E					
C9	3				D	E					
C12	3				D	E					
C5	3				D	E					
C21	3				D	E					
C6	3					E					
C8	3					E					
C1	3						F				
C54	3						F				
C19	3						F	G			
C4	3							G	H		
C14	3								H	I	
C17	3									I	
C55	3										J

Nota: La tabla muestra el número de repeticiones de actividad enzimática por cada cepa y los subconjuntos formados por las diferencias significativas presentadas en sus medias. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 19 se muestran las medias de actividad enzimática de manganeso peroxidasa por cada cepa, teniendo una media mayor en la cepa 55 con un valor de 1,73 U/L, es decir que en la altitud de 3 600 msnm C55 es el microorganismo que mayor actividad enzimática de manganeso peroxidasa posee.

Tabla 19

Análisis estadístico de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por cepas aisladas en la altitud 3 600 msnm

CEPAS	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Grupos TUKEY
					Límite inferior	Límite superior			
C56	3	0,54	0,02	0,01	0,49	0,59	0,53	0,56	A
C11	3	0,73	0,04	0,02	0,63	0,83	0,68	0,76	B
C15	3	0,76	0,02	0,01	0,71	0,82	0,74	0,79	BC
C13	3	0,83	0,01	0,01	0,80	0,87	0,82	0,84	BCD
C18	3	0,82	0,06	0,04	0,67	0,97	0,78	0,89	BCD
C20	3	0,81	0,01	0,00	0,80	0,83	0,81	0,82	BCD
C10	3	0,84	0,02	0,01	0,79	0,90	0,82	0,86	BCDE

C7	3	0,88	0,03	0,02	0,80	0,96	0,85	0,91	CDE
C5	3	0,93	0,01	0,01	0,90	0,95	0,91	0,93	DE
C9	3	0,90	0,00	0,00	0,90	0,90	0,90	0,90	DE
C12	3	0,92	0,01	0,00	0,90	0,94	0,91	0,93	DE
C21	3	0,94	0,03	0,02	0,86	1,03	0,91	0,98	DE
C6	3	0,97	0,03	0,02	0,90	1,03	0,94	0,99	E
C8	3	0,97	0,06	0,03	0,83	1,11	0,94	1,03	E
C1	3	1,14	0,04	0,02	1,05	1,22	1,10	1,17	F
C54	3	1,17	0,10	0,06	0,91	1,42	1,06	1,26	F
C19	3	1,24	0,04	0,02	1,14	1,33	1,20	1,27	FG
C4	3	1,31	0,01	0,01	1,28	1,34	1,30	1,32	GH
C14	3	1,44	0,09	0,05	1,22	1,65	1,35	1,51	HI
C17	3	1,48	0,02	0,01	1,43	1,54	1,46	1,51	I
C55	3	1,73	0,05	0,03	1,61	1,85	1,70	1,79	J

Nota: La tabla muestra el número de repeticiones por cada cepa, las medias, desviación típica, error típico, los límites superior e inferior, el valor mínimo, máximo y los grupos Tukey. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

5.7.2. Análisis estadístico para seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática en la altitud 3 800 msnm.

En la tabla 20 se puede observar que el valor de significancia es menor al 5% demostrando que hay diferencias estadísticas significativas en las medias de actividad enzimática con respecto a las cepas analizadas en la altitud 3 800 msnm.

Tabla 20

Análisis de Varianza de actividad enzimática por cepas aisladas altitud 3 800 msnm

	ANOVA				
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Fisher	Significancia
Inter-grupos	107,9694	16	6,74808525	498,670917	1,57713E-35
Intra-grupos	0,460093	34	0,01353214		
Total	108,4295	50			

Nota: La tabla muestra la suma de cuadrados, grados de libertad, media cuadrática, distribución Fisher y la significancia de actividad enzimática con respecto a las cepas de la altitud 3 800 msnm. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 21 se indica la prueba de Tukey en donde nos muestra los grupos con diferencias estadísticas significativas, los cuales se agruparon de la siguiente manera:

Tabla 21

Método de agrupación de Tukey de actividad enzimática por cepas aisladas altitud de 3 800 msnm

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = .05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
31	3	A									
37	3	A	B								
25	3	A	B	C							
23	3	A	B	C							
28	3	A	B	C							
34	3		B	C							
30	3		B	C							
26	3			C	D						
32	3				D	E					
2	3					E	F				
36	3					E	F	G			
33	3					E	F	G			
22	3						F	G			
35	3							G			
29	3								H		
53	3									I	
27	3										J

Nota: La tabla muestra el número de repeticiones de actividad enzimática por cada cepa y los subconjuntos formados por las diferencias significativas presentadas en sus medias. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 22, se muestran las medias de actividad enzimática de manganeso peroxidasa por cada cepa, teniendo una media mayor en la cepa 27 con un valor de 7,83 U/L, es decir que en la altitud de 3 800 msnm C27 es el microorganismo que mayor actividad enzimática de manganeso peroxidasa posee.

Tabla 22

Análisis estadístico de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por cepas aisladas en la altitud 3 800 msnm

CEPAS	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Grupos TUKEY
					Límite inferior	Límite superior			
C31	3	1,85	0,03	0,02	1,78	1,92	1,82	1,87	A
C37	3	1,93	0,02	0,01	1,88	1,98	1,91	1,95	AB
C23	3	2,09	0,03	0,02	2,02	2,15	2,06	2,11	ABC
C25	3	2,07	0,04	0,02	1,97	2,16	2,03	2,10	ABC
C28	3	2,17	0,06	0,03	2,03	2,32	2,11	2,23	ABC
C30	3	2,25	0,05	0,03	2,14	2,37	2,21	2,30	BC
C34	3	2,23	0,00	0,00	2,22	2,24	2,22	2,23	BC
C26	3	2,30	0,05	0,03	2,17	2,42	2,26	2,35	CD
C32	3	2,64	0,06	0,04	2,48	2,80	2,57	2,69	DE
C2	3	2,77	0,05	0,03	2,63	2,90	2,73	2,83	E
C33	3	2,87	0,01	0,00	2,85	2,89	2,86	2,87	EF
C36	3	2,85	0,03	0,01	2,79	2,92	2,83	2,88	EFG
C22	3	3,05	0,01	0,00	3,03	3,06	3,04	3,05	FG
C35	3	3,14	0,04	0,03	3,03	3,25	3,10	3,19	G
C29	3	4,20	0,03	0,01	4,14	4,27	4,19	4,23	H
C53	3	5,09	0,06	0,03	4,95	5,24	5,03	5,15	I
C27	3	7,84	0,45	0,26	6,71	8,96	7,37	8,27	J

Nota: La tabla muestra el número de repeticiones por cada cepa, las medias, desviación típica, error típico, los límites superior e inferior, el valor mínimo, máximo y los grupos Tukey. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

5.7.3. *Análisis estadístico para seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática en la altitud 4 000 msnm.*

En la tabla 23 se puede observar que el valor de significancia es menor al 5% demostrando que hay diferencias estadísticas significativas en las medias de actividad enzimática con respecto a las cepas analizadas en la altitud 4 000 msnm.

Tabla 23

Análisis de Varianza de actividad enzimática por cepas aisladas altitud 4 000 msnm

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Fisher	Significancia
Inter-grupos	2,10494202	17	0,123820119	58,22046006	4,4373E-21

Intra-grupos	0,07656285	36	0,002126746
Total	2,18150487	53	

Nota: La tabla muestra la suma de cuadrados, grados de libertad, media cuadrática, distribución Fisher y la significancia de actividad enzimática con respecto a las cepas de la altitud 4 000 msnm. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 24 se indica la prueba de Tukey en donde nos indica los grupos con diferencias estadísticas significativas, los cuales se agruparon de la siguiente manera:

Tabla 24

Método de agrupación de Tukey de actividad enzimática por cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm

CEPAS	N	Subconjunto para alfa = .05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
48	3	A								
50	3	A	B							
15	3		B	C						
51	3		B	C	D					
38	3		B	C	D					
47	3			C	D					
52	3			C	D					
16	3			C	D	E				
39	3				D	E	F			
49	3					E	F	G		
46	3						F	G		
24	3							G	H	
41	3							G	H	
42	3							G	H	
43	3								H	
40	3								H	I
44	3								H	I
45	3									I

Nota: La tabla muestra el número de repeticiones de actividad enzimática por cada cepa y los subconjuntos formados por las diferencias significativas presentadas en sus medias. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 25, se muestran las medias de actividad enzimática de manganeso peroxidasa por cada cepa, teniendo una media mayor en la cepa 45 con un valor de 1,35 U/L, es decir que en la altitud de 4 000 msnm C45 es el microorganismo que mayor actividad enzimática de manganeso peroxidasa posee.

Tabla 25

Análisis estadístico de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por cepas aisladas en la altitud 4 000 msnm

CEPAS	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	PRUEBA TUKEY
					Límite inferior	Límite superior			
C48	3	0,63	0,07	0,04	0,47	0,80	0,57	0,70	A
C50	3	0,70	0,04	0,02	0,61	0,80	0,68	0,75	AB
C15	3	0,78	0,05	0,03	0,67	0,89	0,74	0,83	BC
C38	3	0,81	0,01	0,01	0,77	0,84	0,79	0,82	BCD
C51	3	0,80	0,04	0,02	0,69	0,90	0,77	0,84	BCD
C16	3	0,90	0,07	0,04	0,72	1,08	0,82	0,96	CD
C47	3	0,86	0,05	0,03	0,74	0,98	0,83	0,92	CD
C52	3	0,87	0,03	0,02	0,79	0,95	0,84	0,90	CD
C39	3	0,93	0,02	0,01	0,87	1,00	0,91	0,96	DEF
C49	3	1,01	0,04	0,02	0,92	1,11	0,98	1,05	EFG
C46	3	1,05	0,03	0,02	0,98	1,13	1,03	1,09	FG
C24	3	1,10	0,06	0,03	0,96	1,25	1,04	1,16	GH
C41	3	1,10	0,01	0,01	1,07	1,14	1,09	1,12	GH
C42	3	1,12	0,05	0,03	1,00	1,24	1,07	1,17	GH
C43	3	1,20	0,05	0,03	1,09	1,32	1,17	1,26	H
C40	3	1,22	0,03	0,02	1,14	1,30	1,19	1,25	HI
C44	3	1,23	0,08	0,05	1,02	1,44	1,13	1,30	HI
C45	3	1,35	0,02	0,01	1,31	1,40	1,33	1,37	I

Nota: La tabla muestra el número de repeticiones por cada cepa, las medias, desviación típica, error típico, los límites superior e inferior, el valor mínimo, máximo y los grupos Tukey. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Las tablas 19, 22 y 25 presentan los análisis estadístico descriptivo de donde se tomó el mayor valor de las medias de las cepas aisladas para seleccionar las que mayor actividad enzimática de manganeso peroxidasa produjeron en cada altitud, teniendo que la codificada como SB-3600-S2-C55 (cepa C55) fue la que mayor actividad enzimática presentó con un valor de 1,79 U/L en la altitud 3 600, la codificada como SB-3800-S2-C27 (cepa C27) fue la que mayor actividad presentó en la altitud 3 800 con un valor de 7, 84 U/L, finalmente la codificada como SB-4000-S1-C45 (cepa C45) tuvo un valor de actividad enzimática de 1,35 U/L.

5.7.4. *Análisis estadístico general para seleccionar los microorganismos con mayor actividad enzimática.*

En la tabla 26 se puede observar que el valor de significancia es menor al 5% demostrando que hay diferencias estadísticas significativas en las medias de actividad enzimática con respecto a las cepas analizadas en todas las altitudes.

Tabla 26

Análisis estadístico de la actividad enzimática manganeso peroxidasa por cepas aisladas en todas las altitudes

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media Cuadrática	Fisher	Significancia
Modelo	48,31	2	24,15	33,41	< 0,0001
Columna1	48,31	2	24,15	33,41	< 0,0001
Error	38,32	53	0,72		
Total	86,63	55			

Nota: La tabla muestra la suma de cuadrados, grados de libertad, media cuadrática, distribución Fisher y la significancia de actividad enzimática. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 27 se indica la prueba de Tukey en donde nos muestra los grupos con diferencias estadísticas significativas, los cuales se agruparon de la siguiente manera, indicando que en la altitud 3 800 msnm es en donde se encuentran las cepas con mayor actividad enzimática.

Tabla 27

Método de agrupación de Tukey de actividad enzimática de manganeso peroxidasa por cepas aisladas en todas las altitudes

Altitud (msnm)	(U/L)	N de cepas	Error estándar (E.E)	Grupos Tukey
4000	0,98	18	0,2	A
3600	1,02	21	0,19	A
3800	3,02	17	0,21	B

Nota: La tabla muestra la media de actividad enzimática de las cepas aisladas en todas las altitudes, el número de cepas por cada altitud, el error experimental y los subconjuntos formados por las diferencias significativas presentadas en sus medias. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 28 se indican las cepas aisladas que presentaron mayor actividad enzimática en todo el estudio realizado en el páramo del Volcán Chiles.

Tabla 28

Cepas que presentaron mayor actividad enzimática en todas las altitudes

CEPAS	N	Media de MnP (U/L)
C56	3	0,54
C48	3	0,63
C50	3	0,70
C11	3	0,73
C15	3	0,76
C3	3	0,78
C51	3	0,80
C38	3	0,81
C20	3	0,81
C18	3	0,82
C13	3	0,83
C10	3	0,84
C47	3	0,86
C52	3	0,87
C7	3	0,88
C9	3	0,90
C16	3	0,90
C12	3	0,92
C5	3	0,93
C39	3	0,93
C21	3	0,94
C6	3	0,97
C8	3	0,97
C49	3	1,01
C46	3	1,05
C24	3	1,10
C41	3	1,10
C42	3	1,12
C1	3	1,14
C54	3	1,17
C43	3	1,20
C40	3	1,22
C44	3	1,23
C19	3	1,24
C4	3	1,31
C45	3	1,35
C14	3	1,44
C17	3	1,48
C55	3	1,73
C31	3	1,85
C37	3	1,93
C25	3	2,07
C23	3	2,09
C28	3	2,17

C34	3	2,23
C30	3	2,25
C26	3	2,30
C32	3	2,64
C2	3	2,77
C36	3	2,85
C33	3	2,87
C22	3	3,05
C35	3	3,14
C29	3	4,20
C53	3	5,09
C27	3	7,84

Nota: La tabla muestra el número de repeticiones por cada cepa, las medias de actividad enzimática. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

En la tabla 28 se puede observar que todas las cepas aisladas en este estudio las cepas 22,35,29,53 y 27 son las que tiene mayor actividad enzimática de todas las cepas aisladas en el páramo del Volcán Chiles. En el estudio realizado por Moreno & Ospina (2008) en donde analizan la actividad enzimática manganoso peroxidasa en el hongo *Pleurotus Ostreatus* reportan un valor máximo de actividad de 2,14 U/L, mientras que en la presente investigación se obtuvo un valor máximo de 7,84 U/L. Las cepas que tienen actividades enzimáticas mayores a 3,05 U/L puede atribuirse a que los microorganismos aislados se desarrollaron en agar SBD que como indica Condolab (2019) es un medio para cultivar hongos (levaduras, mohos), por lo tanto se puede asumir que por las características macroscópicas que poseen las cepas 55, 27 y 45 que fueron las que presentaron mayor actividad enzimática en cada altitud, y por el medio en que crecieron son hongos al igual que los estudios mencionados anteriormente; con respecto a algunas variaciones de valores podría deberse a las condiciones, ya que los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Ceriporiopsis subvermispora* crecen en otros ecosistemas que no son el páramo. En los estudios que se han realizado hasta la actualidad, no se reportan valores específicos de actividad de manganoso peroxidasa con los que se ha logrado biodegradar plástico polietileno, sin embargo, Méndez (2018) indica que varios hongos entre estos el *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* han logrado biodegradar polietileno de baja densidad por la presencia de

enzimas ligninolíticas como la manganeso peroxidasa. Bhardwaj, Gupta, & Tiwari (2012) reportaron que la actividad MnP del hongo *Phanerochaete chrysosporium* permitió la degradación de polietileno en condiciones limitadas de nitrógeno y carbono. Fujisawa, Hirai, & Nishida (2001) obtuvo que el hongo *Trametes versicolor* al poseer un sistema mediado por lacasas y MnP es un microorganismo biodegradador de polietileno y nylon ya que logró disminuir el peso molecular promedio de PET de 242 000 a 28 300 g/mol en tres días. Rodríguez et al., (2013) en su investigación observó que *Pleurotus ostreatus* degradó durante 45 días polietileno de baja densidad oxobiodegradable sin la utilización de tratamientos físicos previos, disminuyendo así la vida media del polímero. Orhan & Büyükgüngör, (2000) reporta que existió degradación de películas de polietileno de baja densidad en suelo que estuvo incubado por *Phanerochaete chrysosporium*, el proceso de degradación se dio en 6 meses en donde observaron una disminución en el peso molecular del polietileno.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- En el páramo del Volcán Chiles ubicado en la parroquia Tufiño provincia del Carchi se tomaron 3 submuestras de suelo en cada una de las 3 altitudes (3 600, 3 800 y 4 000 msnm), del total de submuestras se aislaron 56 cepas de microorganismos, 21 cepas en la altitud 3 600, 17 cepas en la altitud 3 800 y 18 cepas en la altitud 4 000.
- En las 56 cepas aisladas se determinó que existe actividad enzimática de Manganese Peroxidasa (MnP) con valores que se encuentran en un rango de actividad de 0,54 U/L a 7,84 U/L.
- Los microorganismos con mayor actividad enzimática fueron: La cepa codificada como SB-3800-S1-C22 presentó un valor de 3,05 U/L, la cepa codificada como PDA-3800-S3-C35 un valor de actividad enzimática de 3,14 U/L, la cepa codificada como SB-3800-S3-C29 un valor de 4,20 U/L, la cepa codificada como SB-3800-S1-C53 un valor de 5,09 U/L y finalmente la cepa codificada como SB-3800-S2-C27 con un valor de 7,84 U/L.
- Los microorganismos que reportaron mayor actividad enzimática de manganeso peroxidasa podrían degradar plástico polietileno, según la información bibliográfica encontrada.

6.2. Recomendaciones

- Realizar la identificación de los microorganismos aislados.
- Para medir absorbancias en el espectrofotómetro se recomienda utilizar cubetas de cuarzo.
- Continuar con la investigación y que el siguiente paso a dar sea el de realizar las pruebas de biodegradación de plástico polietileno con los microorganismos aislados en el presente estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, L., & Poveda, J. (2008). *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm TM 3M TM para el análisis de alimentos*. Bogotá, Colombia.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e Identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. Bogotá, Colombia.
- Barrero, L. (2016). *Microbiología clínica*. Madrid: Síntesis, S. A. .
- Benavides, G., & Hermida, A. M. (2008). *Aislamiento e identificación de Flora Bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz verde y Guasca*. Bogotá, Dinamarca.
- Bhardwaj, H., Gupta, R., & Tiwari, A. (2012). *Microbial Population Associated With Plastic Degradation*. Bhopal, India.
- Calderón, M., Romero, H., Cuesta, F., Pinto, E., & Baéz, S. (2013). *Monitoreo de contenidos y flujos de carbono en gradientes altitudinales. Protocolo 1- Versión 1. .* Quito: CONDESAN.
- Camacho, M. (2013). *Los páramos ecuatorianos: caracterización y consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible*. Universidad Central del Ecuador.
- Cárdenas, M. (2015). *Evaluación de la Calidad de los suelos de páramo intervenidos y no intervenidos en la comuna Monjas Bajo, parroquia Juan Montalvo, cantón Cayambe*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Castellón, C., Tejeda, L., & Tejeda, L. (05 de mayo de 2016). *Evaluación de la degradación ambiental de bolsas plásticas biodegradables*.

- Castells, X. (2012). *Reciclaje de residuos industriales: aplicación a la fabricación de materiales para la construcción*. Madrid: Díaz de Santos.
- Chan, W., Heredia, G., & Rodríguez, R. (2015). *Aislamiento y Evualación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México*. Instituto Politécnico Nacional, Veracruz, México.
- Chávez, M., Brito, J. D., Pérez, U., & Delfín, J. (1990). *Temas de Enzimología*. La Habana, Cuba.
- Condolab. (2019). *Agar Dextrosa Sabouraud EP/USP*.
- Córdoba, R., & Cultid, G. (2015). *Estudio Comparativo de la actividad enzimática de lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa del "Pleurotus ostreatus", cultivados en residuos lignocelulósicos de raquis de palma de aceite, bagazo de fique y pulpa de café*. Universidad de Nariño, Nariño, Colombia.
- Cornish, M. L. (1997). *El ABC de los plásticos*. Universidad Iberoamericana.
- Cuevas, J. (2016). *Los Hongos: Héroes y villanos de la prosperidad humana*. *Revista digital universitaria*, p. 1-9.
- Dávila, G., & Vásquez, R. (2006). *Enzimas Ligninolíticas Fúngicas para fines ambientales*. México DF, México.
- Delgadillo, A., González, C., Prieto, F., Villagómez, J., & Acevedo, O. (2011). *Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación*. Pachuca, México.
- Espinoza, A., & Mendoza, R. (2017). *Guía Técnica para Muestreo de Suelos*. Managua: Complejo gráfico TMC.

- Estévez, R. (28 de Agosto de 2019). *Ambientum*. Obtenido de <https://www.ambientum.com/ambientum/residuos/contaminacion-plastico.asp>
- Fujisawa, M., Hirai, H., & Nishida, T. (2001). *Degradation of Polyethylene and Nylon-66 by the Laccase-Mediator System*. Journal of Polymers and the Environment.
- Garbisu, C., Amézaga, I., & Alkorta, I. (2002). *Biorremediación y Ecología*. Obtenido de <http://www.aeet.org/ecosistemas/023/opinion1.htm>
- García, A. (2006). *Estudio de la degradación de residuos lignocelulósicos derivados del procesamiento industrial del cranberry (Vaccinium macrocarpon Ait)*. Valdivia, Chile.
- García, E., Domenech, A., López, A., Oliver, A., & Ramirez, A. (2009). *Prácticas de Microbiología. Manual*. Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca .
- Garzón, J., Rodríguez, J., & Hernández, C. (11 de Agosto de 2017). *Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación*. Bogotá, Colombia.
- Gil, L., Manjarres, K., Piñeros, Y., & Rodríguez, E. (2012). *Influencia de la adición de una fuente de nitrógeno en la producción de ligninasas*. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.
- González, E. H. (2011). *Concepto y estrategias de biorremediación*. Nariño.
- Guía de actividades prácticas*. (2015). Universidad de Córdoba, Argentina.
- Iiyoshi, Y., Tsutsumi, Y., & Nishida, T. (1997). *Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase*. Japón.

- Ishak, N., Kassim, A., Aripin, A., Sharifah, S., & Oluwatosin, A. (2018). *Differential activity of peroxidases and laccase of gut isolated strains in the changing of temperature and pH. Malaysia.*
- Johnson, M. (2012). *Labome*. Obtenido de <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>
- Kuwahara, M., Glenn, J., Morgan, M., & Gold, M. (December de 1983). *Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium . USA.*
- Latorre, N. (2007). *Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los antes. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.*
- Lizarazo, P., & Gómez, D. (2014). *Microbiota rizosférica de Espeletia spp. de los páramos de santa inés y de frontino-urrao. Colombia.*
- Llambí, L. (2012). *Ecología, hidrología y suelos de páramos*. Quito: Flacso Andes .
- López, A. (2006). *Manual de Edafología*. Universidad de Sevilla.
- Madrigal, J. F. (2011). *Manual de plásticos para diseñadores*. México.
- Méndez, L. D. (Diciembre de 2018). *Transformación física, química y microbiológica de polietileno de baja densidad (PEBD) empleando plasma de Oxígeno, fotocatálisis TiO₂/UV y Pleurotus ostreatus*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). *Los microorganismos: pequeños gigantes*. Puebla, México.

- Montoya, S. (2008). *Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto Grifola frondosa. (Tesis Maestría).* Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Manizales.
- Moreno, N., & Ospina, X. (2008). *Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando Pleurotus ostreatus inmovilizado en fique.* Bogotá, Colombia.
- Novoa, C. (2011). *Efectos inhibitorios y hemolíticos de las toxinas clostridiales sobre las diferentes especies de Clostridium spp aisladas e identificadas. Tesis.* Universidad de la Salle, Bogotá.
- Orhan, Y., & Büyükgüngör, H. (2000). *Enhancement of biodegradability of disposable polyethylene in controlled biological soil.* Ondokuz Mayıs University, Turkey.
- Pacasa, F., Loza, M., Flores, A., Vино, L., & Serrano, T. (2017). *Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani.* La Paz, Bolivia.
- Perdomo, G. (Abril de 2002). *Plásticos y Medio Ambiente.* Venezuela.
- Pérez, D., & Zárate, M. (2013). *Determinación de la flora micológica del maíz seco y su harina. Tesis de grado.* Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Pírez, M., & Mota, M. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología: morfología y Estructura Bacteriana.* Universidad de la República, Montevideo.
- (2015). *Plan de Ordenamiento Territorial de la Provincia del Carchi.* Carchi.
- Quintero, J., Feijoo, G., & Lema, J. (2006). *Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos.* Colombia.
- Ramírez, J., & Ayala, M. (2014). *Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan?* México.

Rincón, J., Rincón, P., Mondragón, A., Torres, E., Ortiz, M., Jiménez, E., . . . Arana, A. (2016).

Producción de enzimas hidrolíticas por fermentación sólida en mesocarpo de coco con Trametes polyzona. México.

Rodríguez, J. M. (2013). *Degradation of Oxo-Biodegradable Plastic by Pleurotus ostreatus.*

Rojas, A. (2011). *Conceptos y prácticas de microbiología general.* Colombia.

Sánchez, D., Gavilán, R., & Vignale, N. (2018). *Estudio de los bosques subtropicales de montaña de la "reserva ecológica de uso múltiple Serranías de Zapla" (Jujuy, Argentina): composición florística, distribución de la vegetación y caracterización bioclimática.* Universidad Complutense, Madrid.

Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). *Siembra y recuento de microorganismos. Manual de laboratorio.* Universidad Tecnológica Nacional, Rosario.

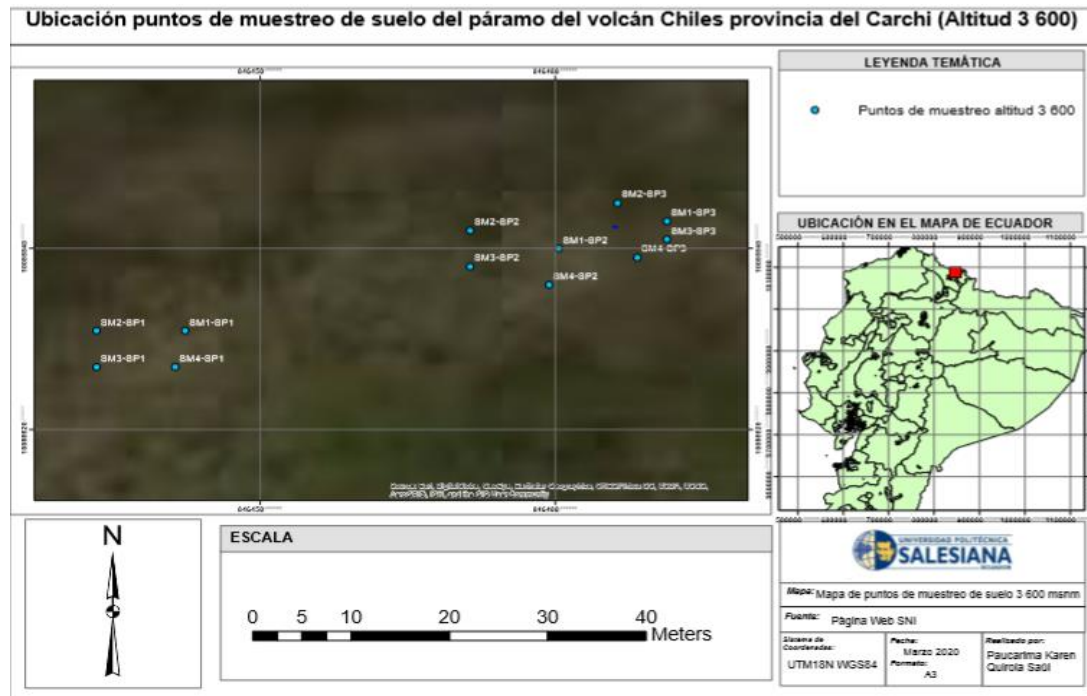
Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2007). *Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables.*

Shahid, M., Rasul, I., & Azeem, F. (05 de Enero de 2018). *Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety.* Germany.

Villarroel, R. (2016). *Técnicas de muestreo de suelo para análisis de fertilidad.* Chile.

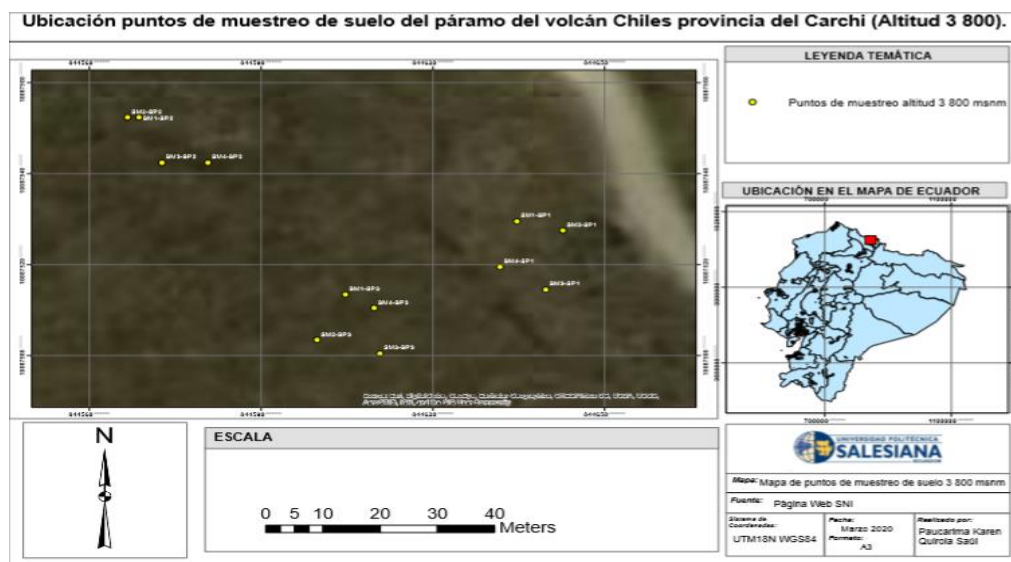
8. ANEXOS

Anexo 1 Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 3 600 msnm.



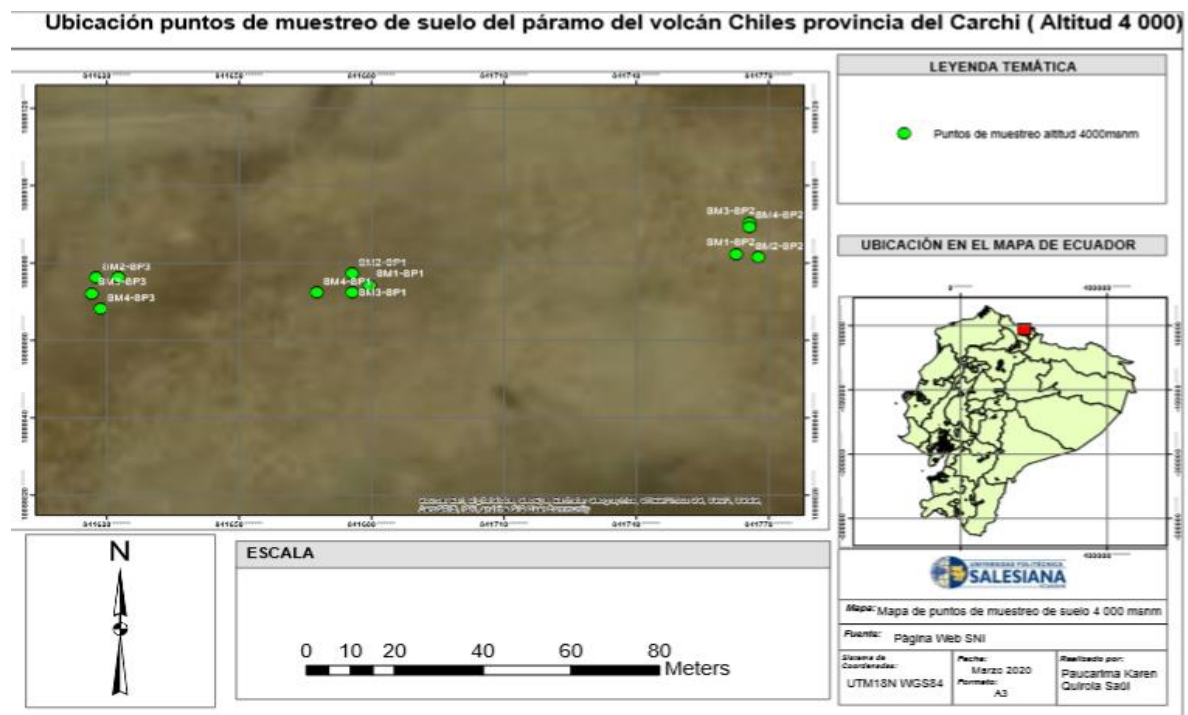
Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 3 600. Elaborado por: Paucařima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 2 Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 3 800 msnm.



Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 3 800. Elaborado por: Paucařima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 3 Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 4 000 msnm.



Ubicación geográfica de los puntos de muestreo altitud 4 000. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 4 Área de estudio en el páramo del volcán Chiles



Páramo del Volcán Chiles. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 5 Dispensación de medios de cultivos en las cajas Petri



Preparación de las cajas Petri para cultivo de microorganismos. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 6 Crecimiento de microorganismos de la siembra en superficie



Cepas de microorganismos sin aislar. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 7 Cepas aisladas del suelo del páramo



Cepas aisladas. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 8 Solidificación del agar en matraces Erlenmeyer para la obtención del extracto enzimático



Solidificación del medio de cultivo en la cámara de flujo laminar. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 9 Incubación de los matraces Erlenmeyer para el crecimiento de microorganismos aislados



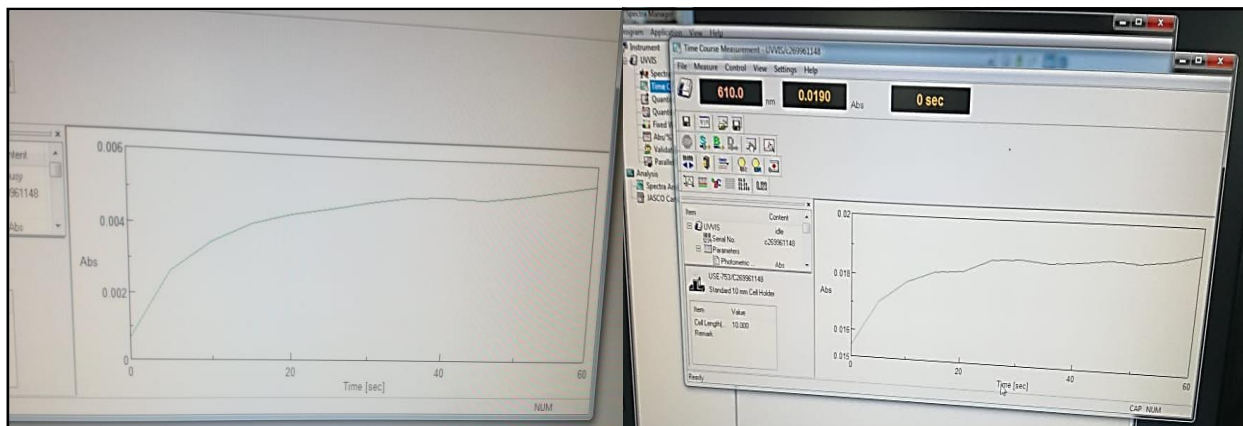
Incubación de microorganismos aislados para obtención de extracto enzimático Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 10 Muestras en el agitador orbital



Muestras en el agitador orbital para obtener el extracto enzimático. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 11 Curvas de absorbancia



Curvas de absorbancia vs tiempo en el programa SpectraManager. Elaborado por: Paucarima Karen, Quirola Saúl (2020).

Anexo 12 Cálculos para preparación de solución madre de HCl

$$\frac{37 \text{ g HCl}}{100 \text{ g de disolución}} \times \frac{1,18 \text{ g de disolución}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{\text{L}} = 436,6 \text{ g HCl/L}$$

$$\# \text{ de moles} = \frac{\text{masa total}}{\text{masa molecular}}$$

$$\# \text{ de moles} = \frac{436,6 \text{ g/L}}{36,5 \text{ g/mol}}$$

$$\# \text{ de moles} = 12 \text{ moles/L}$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$12M \times 10\text{mL} = C_2 \times 100\text{mL}$$

$$C_2 = 1,2 \text{ M}$$

- La solución madre de HCl que se preparó fue con 10ml de HCl y aforado a 100 ml con agua destilada la cual se usó para la preparación del buffer succinato de sodio

Anexo 13 Cálculos para la preparación del buffer succinato de sodio pH de 4,5

$$pH = pka + \log \frac{\frac{\# \text{ de moles del ácido conjugado} - \# \text{ moles HCl}}{V \text{ total}}}{\frac{\# \text{ de moles de HCl}}{V \text{ total}}}$$

$$4,5 = 5,6 + \log \frac{\frac{\# \text{ de moles de succinato} - 0,01 \text{ moles}}{0,5 \text{ L}}}{\frac{0,01 \text{ moles}}{0,5 \text{ L}}}$$

$$\text{antilog}(-1,1) = \frac{\frac{\# \text{ de moles de succinato} - 0,01 \text{ moles}}{0,5 \text{ L}}}{\frac{0,01 \text{ moles}}{0,5 \text{ L}}}$$

$$0,079 \times 0,01 = \# \text{ de moles de succinato} - 0,01$$

$$\# \text{ de moles de succinato} = 0,02079$$

$$0,079 = \frac{0,02079 - \# \text{ moles de HCl}}{\# \text{ moles de HCl}}$$

$$\# \text{ de moles de HCl} = 0,018535$$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1,2M \times V_1 = 0,018535 \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = 15.44 \text{ mL}(\text{Solución madre})$$

Cantidad que se pesó de succinato de sodio salino

$$[\text{Succinato de sodio salino}] = 0,02 \text{ M}$$

$$[\text{HCl}] = 0,018535 \text{ M}$$

$$\frac{0,02 \text{ M}}{L} = \frac{g \text{ de soluto}}{160,05 \text{ g/mol}(1L)} = 3,2 \text{ g}$$

Anexo 14 Cálculos para la preparación del lactato de sodio

$$x = \frac{0,025 \text{ M}}{L} \times \frac{112,06 \text{ g}}{M} \times 0,1 \text{ L}$$
$$x = 0,28015 \text{ g}$$
$$x = \frac{0,28015 \text{ g} \times 100 \text{ g}}{70 \text{ g}} = 0,400 \text{ g} \times \frac{mL}{1,33 \text{ g}} = \mathbf{0,30 \text{ mL}}$$

Anexo 15 Preparación de reactivos que se usaron en el método de oxidación del rojo fenol.

- Rojo Fenol: Se pesó 0,01 g de rojo fenol y se disolvió en 100 mL de agua destilada, el pH de agua destilada debe ser de 7 antes de mezclar el colorante. El reactivo se debe almacenar en frasco ámbar a 4 °C.
- Lactato de Sodio: Medir 300 µL de lactato de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada, el pH debe ser de 4,5. El reactivo se debe almacenar en frasco ámbar a 4 °C.
- Sulfato de Manganeso: Se pesó 7,5 mg y disolver el 500 mL de agua destilada. El reactivo se debe almacenar en frasco ámbar a 4 °C.
- Albúmina Sérica Bovina: Se pesó 125 mg y se disolvió en 125 mL de agua destilada. El reactivo se debe almacenar en frasco ámbar a 4 °C.
- Succinato de Sodio: Se midió 15,44 mL de solución madre HCl y se diluyó en un poco de agua destilada, se pesó 3,2 g de succinato de sodio salino y se diluyó en un poco de agua destilada, se mezcló ambas soluciones en un balón aforado y se aforó a 1000 mL. El reactivo se debe almacenar en frasco ámbar a 4 °C.
- Peróxido de Hidrógeno: Medir 2,83 µL y aforar a 1000 mL. El reactivo se debe almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.